



HAL
open science

Étude des fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes T et de leurs impacts sur la réponse immunitaire antitumorale

Christophe Hibos

► To cite this version:

Christophe Hibos. Étude des fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes T et de leurs impacts sur la réponse immunitaire antitumorale. Biologie cellulaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. NNT : 2023UBFCI005 . tel-04473530

HAL Id: tel-04473530

<https://theses.hal.science/tel-04473530>

Submitted on 22 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 DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

PRÉPARÉE À :

L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

Unité mixte de recherche 1231

École doctorale n°554 Environnements – Santé

Doctorat de : **Biologie Cellulaire**

Spécialité : **Immunologie et Immunothérapie des cancers**

Par

M. Christophe HIBOS

Étude des fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes T et de leurs impacts sur la réponse immunitaire antitumorale

Thèse présentée et soutenue publiquement à **Dijon**, le **28 avril 2023**

Composition du Jury :

Civilité, Nom, prénom

Fonction et établissement d'exercice

Pr. PAUL Catherine

Dr. PY Bénédicte

Dr. MARIE Julien

Dr. CAUX Christophe

Dr. VEGRAN Frédérique

PU, EPHE (Dijon)

CR INSERM, CIRI (Lyon)

DR INSERM, CRCL (Lyon)

DR INSERM, CRCL (Lyon)

CR INSERM, CTM (Dijon)

Présidente du jury - Examinatrice

Rapporteuse

Rapporteur

Examinateur

Directrice de thèse

« En ce qui me concerne, j'ai toujours été fasciné par les détenteurs de vérité qui, débarrassés du doute, peuvent se permettre de se jeter tête baissée dans tous les combats que leur dicte la tranquille assurance de leurs certitudes aveugles. » Pierre Desproges

« La morale n'est rien de plus que la régularisation de l'égoïsme » Jeremy Bentham

« Aucun grand philosophe du passé n'a utilisé l'expression "sens de la vie". Pourquoi voudriez-vous que la vie ait une signification ? Elle n'est ni un discours, ni un symptôme. L'essentiel, ce n'est pas de savoir si la vie à un sens, mais si l'on est capable de l'aimer. Ce n'est pas le sens qui est aimable, c'est l'amour qui fait sens. » André Comte-Sponville



Résumé

Une personne sur 6 développe un cancer au cours de sa vie. Il s'agit de la première cause de mortalité prématurée en France, à cause du manque de thérapies efficaces pour les cancers avancés. Ainsi, il demeure impératif de développer de nouvelles approches thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge de ces maladies. L'immuno-oncologie est une discipline récente qui repose sur l'étude des interactions entre le système immunitaire et les tumeurs. Dans la grande majorité des cancers, les cellules lymphocytaires T CD8 infiltrant les tumeurs sont associées à une survie plus longue des patients. Le rôle des T CD4 est cependant plus contrasté. Malheureusement et à cause des interactions entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales, la réponse des lymphocytes T s'affaiblit au cours du temps. Hélas, bien qu'il existe des traitements permettant de restaurer leurs fonctions, le taux de réponse des patients à l'immunothérapie dépasse rarement 20%. De fait, un des défis actuels de la recherche consiste à comprendre les mécanismes moléculaires de la réponse immunitaire antitumorale, afin de généraliser et de reproduire les « miracles de l'immunothérapie ».

La protéine NLRP3 est un membre de la famille des récepteurs de type Nod (NLR). Son rôle a particulièrement été décrit dans les cellules de l'immunité innée, où la protéine cytoplasmique NLRP3 forme un complexe appelé l'inflammasome. L'activation de ce complexe par des signaux de dangers permet la synthèse de molécules inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18, nécessaires pour activer le système immunitaire et induire la mort des cellules tumorales ou infectées par des pathogènes. Dans le cas des cellules lymphoïdes, il a été observé par notre équipe que la protéine NLRP3 possède également des fonctions indépendantes de l'inflammasome et qu'elle module l'activité des cellules CD4 Th2 (Bruchard *et al.*, 2015). Ce travail de recherche est basé sur des données préliminaires montrant que la déficience en NLRP3 affecte non seulement l'activation des cellules CD4 Th2, mais aussi CD4 Th17 et T CD8.

Pour la première fois, nous avons mis en lumière un rôle indépendant de l'inflammasome et immunosuppresseur de NLRP3 dans ces populations. Grâce à ces travaux, nous pensons que NLRP3 régule l'activation et/ou la différenciation des lymphocytes T CD4 et T CD8 chez la souris, permettant l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'éviter, voire d'inverser, l'immunosuppression associée à NLRP3.



ÉCOLE DOCTORALE
Environnements - Santé
Bourgogne | Franche-Comté

Abstract

One in 6 people will develop a cancer in their lifetime. It is the leading cause of premature death in France, due to the lack of effective long-term therapies for advanced cancers. Based on this observation, it is imperative to develop new therapeutic approaches to improve the management of these diseases. Immuno-oncology is a recent discipline arousing great hopes and which is based on the study of the interactions between the immune system and tumors. Indeed, in most cancers, tumor infiltrating CD8 T cells are associated with longer patient survival. On the other hand, the role of CD4 T cells is more contrasted. Although the antitumor response of T cells weakens over time, antibody-based immune checkpoint inhibitors can restore this function. The decrease in side effects and the effectiveness of these therapies have revolutionized cancers management. However, the response rate of patients to immunotherapy rarely exceeds 20% and one of the challenges is to understand the molecular mechanisms of the anti-tumor immune response, to generalize and reproduce the "miracles of immunotherapy".

The NLRP3 protein is a member of the Nod-like receptor (NLR) family. Its role has been particularly described in the cells of innate immunity, where the cytoplasmic protein NLRP3 forms a complex called inflammasome. Activation of this complex allows the synthesis of inflammatory molecules, IL-1 β and IL-18, necessary to activate the immune system and induce the death of tumor or infected cells. In the case of lymphoid cells, it was observed by our team that the NLRP3 protein has also inflammasome-independent functions and modulates the activity of CD4 Th2 cells (Bruchard *et al.*, 2015). This work is based on preliminary data showing that NLRP3 deficiency affects not only CD4 Th2 differentiation, but also CD4 Th17 and CD8 T cells. For the first time, we shed light on an inflammasome-independent and immunosuppressive role of NLRP3 in these populations.

Through our work, we have demonstrated that NLRP3 regulates the activation/differentiation of CD4 and CD8 T cells in mice, allowing us to discover potential targets to avoid or reverse the immunosuppression related to NLRP3 in T cells.

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble du jury ayant accepté d'évaluer mon travail. Tout particulièrement, je remercie la Dr. Bénédicte Py et le Dr. Julien Marie d'avoir accepté de prendre de leur temps afin d'être mes rapporteurs et de me faire bénéficier de leur expertise scientifique. Je les remercie également de leur patience dans nos échanges respectifs. Je remercie également le Dr. Christophe Caux et la Pr. Catherine Paul d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail et je me réjouis d'avance de pouvoir échanger avec un jury d'une telle qualité. Je tiens aussi à remercier Christelle Caillot pour son aide inconditionnelle dans les procédures administratives qui sont loin d'être ma tasse de thé (au jasmin).

Je tiens à remercier le professeur François Ghiringhelli, de m'avoir accueilli au sein de son équipe toutes ces années et de m'avoir fait profiter de son expertise scientifique sur les projets où nous avons pu interagir ensemble. Tu as aussi été mon médecin de famille lorsque des conditions difficiles l'ont exigé. Tu as été un médecin pédagogue, bienveillant et impliqué. Pour toutes ces raisons, je te remercie sincèrement, ainsi que ton interne Thibault.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Romain Boidot, mon premier maître de stage en première année de maîtrise. Toi et Antoine m'avez appris la biologie moléculaire et j'ai pu faire mes premiers pas dans le milieu de la recherche. Tu as su allier bienveillance et rigueur scientifique, travailler avec toi a été très agréable.

Je remercie l'entière des camarades qui m'ont suivi ou me suivent depuis le début de mes études. J'ai une pensée particulière pour vous deux, Jérémy et Léo, qui êtes partis en licence pour prendre votre indépendance dans de plus grandes villes. Je repense souvent à nos repas « RU » qui ont été une sacrée source de rires. Je pense aussi à vous, Lucie et Thomas et à notre groupe des lapins de la biologie ! Un grand merci aussi à tous mes camarades de master et de thèse, qui m'ont aidé dans ce voyage scientifique qu'est la thèse. Un merci tout particulier à toi Camille, pour avoir donné de ton temps et relu le draft de ce présent manuscrit afin de me faire bénéficier de ton expertise littéraire sans faille ! Je pense aussi à vous, monsieur Aymeric, avec qui nous avons tant discuté de la thèse, à Julie (aujourd'hui « post-doc » de grande qualité !), à Aude, Clarisse, Baptiste, Mathilde, Maude, Liline, Aleksandra et j'en oublie encore très certainement. Merci à vous tous.

Merci à toi Mélanie pour toute l'aide que tu m'as apporté, quand j'avais besoin de conseils, sur fond d'humour noir et d'ironie ! Ton esprit aiguisé m'a permis de mieux comprendre le monde impitoyable de la recherche. Travailler avec toi m'aura apporté beaucoup de maturité scientifique. Ta bonne humeur et ton dynamisme sont un réel plaisir au quotidien.

A Théo et Akhésa, le duo indissociable ! Malgré nos divergences, je vous suis profondément redevable pour tous les instants que nous avons passés ensemble. Théo, ton savoir inépuisable m'a beaucoup aidé lors de mes débuts en tant que stagiaire. Je suis profondément admiratif de ton esprit critique, capable en toute circonstance d'analyser rationnellement les

choses. Je pense que tu es un scientifique exemplaire, qui mérite d'aller loin. Le projet NLRP3 serait très différent sans toi, aujourd'hui. Zaza, nos longues conversations nocturnes sur la vacuité du monde, la science, la famille, les relations, etc... M'ont beaucoup marqué. Je serais certainement un homme différent aujourd'hui si tu n'avais pas été là toutes ces années pour m'épauler dans la vie !

Fanny « Dame Chalmin », quel plaisir de travailler avec vous. Toujours souriante, toujours agréable, toujours humble, en un mot : toujours formidable. Ta bienveillance et ta sagacité ont fait de moi un meilleur scientifique et un meilleur être humain. Vous faites partie de ces personnes qui embellissent le monde du travail, où tout devient plus triste sans vous. J'espère continuer à échanger régulièrement avec toi, ton avis étant très important à mes yeux. N'oublie jamais que tu es l'artisane de ta réussite et je suis admiratif de tout ce que tu as accompli en tant que scientifique.

Je remercie l'intégralité des personnes qui ont travaillé avec moi au quotidien, sur ce magnifique projet CD8 (n'oubliez pas Emma, quand on ne sait pas comment faire, on essaie !). Merci à toi mon petit Alvin (Vivine), pour toutes ces qPCR! Je pense que je me souviendrai toujours de ton goût particulier pour les couleurs flashy lors des présentations orales ! Rayyân (Monsieur Rayyou !), tu as été un stagiaire exceptionnel. Tu n'as pas arrêté de m'impressionner par tes connaissances théoriques, ta curiosité, ta culture générale et ton envie d'apprendre toutes les techniques de laboratoire possibles et imaginables. Je pense très sincèrement que tu iras très loin. Bon courage à toi pour la suite, j'espère que le regard du « Maître Hibos » (comme tu m'appelles) continuera de t'inspirer rigueur et ouverture d'esprit !

Monsieur Clément, futur médecin à l'avenir radieux, je ne manquerai pas de vous prévenir afin d'avoir vos précieux conseils lorsque j'aurais décidé de fouler du pied le Japon « Watashi wa hajime mashite, mina-san ! » nous aurons alors l'occasion de rechanter pour la énième fois « Binkusu no sake wo ». J'espère en tant qu'encadrant avoir pu vous montrer à quel point la science est belle et demande rigueur, patience et réflexion. Je suis convaincu que vous serez un médecin formidable pour vos futurs patients et j'espère vous revoir au détour d'un sushi, accompagné de bon saké.

Laura, mon plus gros regret est que tu n'aies pas pu être celle qui prendrai mon relai. Tu as été une stagiaire d'une grande qualité, toujours rigoureuse, avec énormément de compétences scientifiques et humaines. Tu avais toutes les qualités requises pour avoir une brillante carrière en recherche et ta plus grosse erreur n'aura été finalement que d'être « jugée par des porcs » selon la formule de la fable du Corbeau et du Rossignol. Leur suffisance a été une insulte à ce que représente le monde de la science, dont l'ouverture d'esprit m'est si chère. Merci pour ton aide sur le projet, je te souhaite sincèrement de réussir dans la voie que tu t'es tracée aujourd'hui, car tu le mérites vraiment !

Lylou ! Ma « petiote » ! Tu es au début de ton périple ! Ta motivation et ton implication font que je suis sûr que tu réussiras à prendre en main le projet NLRP3 et que tu seras une

excellente scientifique ! Mais n'oubliez jamais : « Jafar, j'suis coincé ! » euh, je veux dire : n'oubliez pas, si ça ne fonctionne pas, on réessaye !

Elise ! François ! Docteur Jacquin, Mister Hermetet ! Votre bienveillance à tous les deux et votre incroyable compétence scientifique m'auront marqué. L'un et l'une comme l'autre, ne changez rien ! Restez aussi souriants, brillants et agréables que vous êtes, car vous faites le bonheur de ceux qui vous entourent grâce à votre humour et votre bonne humeur. Travailler avec vous a été d'un plaisir immense.

Joséphine, dite « Dame Josy » ou bien « mon ex-femme » tant nous aimions nous chamailler. J'espère continuer à prendre une petite tasse de thé avec vous de temps en temps ! Votre noirceur est un délice à côtoyer et avec vous, je me sens plongé dans l'univers délicieusement gothique de la famille Addams. Il ne nous manque qu'un violoncelle jouant « paint it, black » en fond. Remplie de cynisme, d'humour noir et de prozac, j'ai « beaucoup parlé de vous à mon psy ». Vous avez été une amie précieuse pendant toutes ces années, à qui j'ai pu confier tous les doutes qui entouraient ma vision du monde et du travail. Philosophie, littérature, psychologie, vous avez su être une oreille attentive et nos échanges m'ont, par certains côtés, transformés. Je vous remercie d'avoir été là, tout ce temps, pour m'aider dans le projet comme dans ma vie.

Monsieur Romain ! Votre humour, votre absolue rigueur et votre goût pour le blues font de vous un parfait camarade, tant pour travailler au quotidien, que pour se jeter un godet devant Kaamelott (« mais tout à fait ! »). Vous m'avez appris le sens du détail sur fond d'Amaretto (au petit goût sucré) et votre avis scientifique a toujours été d'un grand secours (« Ah mais moi j'ai toujours dit ! »). Vous êtes d'une grande aide au quotidien et j'espère que l'on continuera à se voir régulièrement !

Mannon « deux n », le bourreau de travail le plus brillant qui m'ait été donné de rencontrer ! Ton arrivée a soufflé un vent de fraîcheur au troisième étage, tu as mis en place, rénové et changé tellement de choses ! Nos pratiques et notre organisation ont progressé dans des proportions vertigineuses grâce à toi. Tu as réussi à supporter mon cynisme et ma dépression ambiante sans jamais baisser les bras. Sans ton incroyable rigueur et ta force de caractère, ma thèse ne serait pas aussi aboutie. Je suis admiratif de tout ce que tu as réussi à accomplir en si peu de temps. Je n'ai absolument aucun doute sur le fait que ta carrière sera extrêmement brillante. Nos folies réciproques se sont bien trouvées pour passer d'agréables moments, au labo ou en dehors !

Monsieur Antoine... Que dire au sujet de « Maître Antoine » ? Vous qui m'avez encadré en M1, vous qui « m'avez créé à votre image » de vieux barbu bourru cynique et complètement déjanté ! Vous qui m'avez baptisé Maître Hibos, sobriquet si répandu que les gens en ont oublié mon prénom. Serais-je l'homme que je suis aujourd'hui sans vous ? La réponse est : certainement pas (ou alors « un peu plus à l'ouest »). Qu'aurais-je été sans vous, qu'un balbutiement ? C'est en forgeron que l'on devient forgeant (ou l'inverse, je ne sais plus) et dieu sait qu'avec vous, on en a forgeronné, des manip. Du milieu de culture cellulaire au whisky, jusqu'à la signature de mon contrat de thèse « pantoufle » vos remarques pleines

d'humour et toujours cinglantes m'ont accompagnées avec plaisir au quotidien. Depuis votre départ du labo, il n'y a plus personne pour jouter (« sans oublier le o, sinon c'est sale ») avec moi, que ce soient des vers d'Aragon, ou les jurons du capitaine Haddock (dont vous êtes l'heureux propriétaire d'un dessin d'artiste !). Vous seul aviez le bagage nécessaire pour répondre à mon esprit malade. « Vivre c'est choisir et choisir c'est renoncer (Karl Marx) », j'espère que vous ne renoncerez jamais à votre personnalité ! Vous avez été et êtes encore le pilier scientifique auquel je me raccroche dans mes périodes de doute. Votre souvenir est impérissable et j'espère que dans votre paradis blanc Canadien (ou enfer glacé, selon moi, osti de câlisse de sainte vierge) vous pensez encore parfois, au cœur de la nuit, aux phrases de Nietzsche, de Kant ou de Marc-Aurèle que je vous déclamais « mais vous allez la fermer, oui ? ». Je chante une dernière fois en votre honneur « Oh Ratigan » ! Cette guerre impermanente, sur fond d'amitié, est une des plus belles choses que j'emporte au creux de ma période Dijonnaise. Soyez assuré de mon affection la plus sincère, vous qui fûtes, êtes, et serez toujours mon « Maître Antoine ». Mais... « Vous avez pas des manip, vous ? ».

À Frédérique, « Fred » ou bien « la patronne », comme j'aime le dire. Voilà maintenant 4 ans en tout et pour tout que tu me subis ! Mon caractère, ma vision des choses, parfois étrange, mes aspirations, tu as tout supporté, même quand cela pouvait t'agacer. Tu m'as laissé énormément de place pour m'exprimer et être moi-même. Nous avons toujours pu et su discuter, aussi bien de nos aspirations scientifiques, qu'humaines. Ta formule « même si elle est fermée, la porte de mon bureau est toujours ouverte » s'est toujours vérifiée. Tu t'es toujours rendue disponible quand j'avais besoin de toi, parfois même en urgence, face à ma difficulté à tenir les deadlines. C'est à toi que je dois mon entrée en thèse et tu as été une mentore exceptionnelle, à la hauteur de la vision d'excellence que j'avais de cette équipe. Je n'aurais jamais pu aller aussi loin sans toi et ton soutien sans faille. Nous avons finalisé bon nombre de projets ensemble et j'espère que tu gardes un aussi bon souvenir de moi, que celui que je garde de toi. Merci à toi, je n'oublierai pas tout ce que tu as fait pour moi.

À mes parents « mamie Bos et papi Bos », depuis peu ! Ces dernières années ont été sacrément compliquées, auto-immunité, cancer et covid, malgré la vie qui vous a beaucoup secoué, vous avez toujours été là pour moi. Vous m'avez soutenu envers et contre tout et Blanzky reste mon petit havre de paix où je sais que je pourrai me reposer loin de tout, avec notre « minette pouet pouet », grosse peluche à ronron. Même si je suis un peu plus loin de vous dernièrement, soyez assurés qu'où que je sois, je penserai toujours à vous et à votre générosité immense. Vous avoir auprès de moi le jour de ma soutenance est un de mes souhaits les plus chers.

À mon frère et ma belle-sœur « Kiki et Maggy », vous avez été une source incroyable de bonheur ces dernières années. Votre union, la maison, les fêtes à Chille, la naissance de petit Antoine, mon neveu et filleul, ont été autant d'occasions de se retrouver dans la joie et de faire la fête. Vous aussi, vous avez toujours été là quand j'en avais besoin et vous savoir avec moi le jour de ma soutenance me rassure et me procure énormément de joie. Pour petit Antoine, même si tu n'as pas encore l'âge pour lire ces mots, sache que ta bonne santé et ton

sourire sont aussi deux sources inépuisables de bonheur pour moi. J'espère que tu auras envie de lire ce gros pavé (César) en grandissant pour voir ce que tonton faisait pour tes 1 an !

À Nadine, nous en avons vécu des choses tous les deux. Lorsque tu es tombée malade début 2021, j'ai voulu que tu aies la meilleure prise en charge possible, à Dijon. Malgré tous nos efforts, la maladie l'a emporté quelques mois plus tard. Grâce à André Comte-Sponville et surtout l'Homme étoilé, avec ses livres « je serai là, comment je suis devenu l'homme étoilé » et « à la vie » j'ai pu gérer cette période difficile au mieux. « Les soins palliatifs, c'est tout ce qu'il reste à faire, quand il n'y a plus rien à faire. Mais que reste-t-il à faire, alors ? A rajouter de la vie aux jours, à défaut de jours à la vie ». J'ai été auprès de toi, chaque jour, dans cette optique. J'espère avoir pu t'éviter au maximum la solitude de l'hôpital et que de là où tu es, tu me regarderas, ce 31 mars.

À Stéphane, mon compagnon, mon soutien absolu et immuable de cette dernière année. Tu es celui qui m'a sorti de ma torpeur. Même si le temps passe, j'ai l'impression de t'avoir rencontré il y a quelques jours seulement. Tout est passé si vite, avec toi ! Ton affection et ton aide au quotidien m'ont rendu plus fort et m'ont permis d'aller au bout de tout ce travail. Merci à toi d'être là, merci d'être entré dans ma vie, merci de m'aimer, merci d'être toi, tout simplement. Ta présence à mes côtés est ce qui me rend le plus heureux du monde, tu es un compagnon formidable, dont je serai toujours fier. Je t'aime.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Remerciements.....	5
Table des matières.....	10
Abréviations	13
Introduction.....	15
Préambule	15
1. Impact du système immunitaire sur le développement des tumeurs	16
1.1. Découverte de l'immunosurveillance	16
1.2. Le façonnage des tumeurs par l'immunoédition.....	17
1.2.1. Préquel : origine génétique du cancer et fardeau mutationnel	17
1.2.1.1. Néoantigènes et immunité.....	18
1.2.2. Equilibre et échappement	18
1.3. Tumeurs : entre inflammation et immunosuppression.....	21
1.3.1. Inflammation : pro- ou antitumoral ?	21
1.3.2. Tumeurs froides : mécanismes d'immunosuppressions	23
2. Le paradoxe des lymphocytes Th17 : pro-ou anti-inflammatoires ?.....	27
2.1. Différenciation des lymphocytes Th17	27
2.2. Plasticité : le paradoxe des Th17	29
2.3. Impact des Th17 sur l'immunité antitumorale.....	33
3. Les lymphocytes T CD8 : acteurs majeurs de la réponse antitumorale	33
3.1. Un groupe moins homogène qu'il n'y paraît	33
3.1.1. Activation	33
3.1.2. Différenciation	34
3.2. Lymphocytes T CD8 : des cellules antitumorales	36
3.2.1. Cytotoxicité et inflammation.....	36
3.2.1.1. Granzyme B, perforine et granulysine.....	36
3.2.1.1.1. TNF- α , Fas et TRAIL	37
3.2.1.1.2. L'IFN- γ	38
3.2.2. Recrutement des T CD8 par les tumeurs.....	38
3.3. Limites de la réponse antitumorales des T CD8 : l'épuisement	39
4. Immunothérapies.....	40

4.1.	Définitions	40
4.2.	Anticorps spécifiques et associations des thérapies	41
4.3.	Thérapies cellulaires : principe et limites.....	44
5.	NLRP3	46
5.1.	Structure de NLRP3.....	46
5.2.	De la protéine à l'inflammasome NLRP3	48
5.2.1.	Premier signal : l'amorçage	48
5.2.1.1.	Signaux transcriptionnels	48
5.2.1.2.	Signaux non transcriptionnels	48
5.2.2.	Second signal : l'activation	49
5.2.2.1.	Signaux ioniques	49
5.2.2.1.	Ruptures lysosomales.....	50
5.2.2.1.	Mitochondries et ROS	51
5.2.1.	Formation de l'inflammasome NLRP3 et conséquences.....	51
5.3.	Fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3	54
5.3.1.	NLRP3, TGF- β et fibrose	54
5.3.1.	NLRP3, un acteur nucléaire	56
5.3.1.	NLRP3 et réparation de l'ADN	58
5.1.	NLRP3 : une cible thérapeutique ?	58
5.1.1.	NLRP3, auto-immunité et système nerveux.....	58
5.1.2.	Maladies cardiovasculaires et diabète	60
5.1.3.	NLRP3 et cancer : allié ou ennemi ?.....	61
	Objectif du travail de thèse	63
	NLRP3 régule la transdifférenciation des lymphocytes Th17 par le truchement de fonctions indépendantes de l'inflammasome	64
	INTRODUCTION	65
	MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	66
	RÉSULTATS.....	71
	Rôle de NLRP3 dans la biologie des lymphocytes T CD8.....	95
	INTRODUCTION	96
	MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	97
	RÉSULTATS.....	100
	Discussion : Rôles indépendants de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes T.....	118
	Références bibliographiques.....	125
	Annexes.....	150

Travaux collaboratifs.....	154
NLRP3 drives Th17 trans-differentiation through non-canonical function.....	156

Abréviations

α -SMA : Actine alpha des muscles lisses

ALK : Anaplastic lymphoma kinase

Ahr : Aryl hydrocarbon receptor

AP-1 : Activator protein 1

ARC : Association pour la recherche contre le cancer

ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a card domain

ASIC : Acid-sensing ion channels

ATM : Ataxia telangiectasia mutated

ATP : Adenosine triphosphate

Bcl-6 : B-cell lymphoma 6

BRCC3 : BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3

CAF : Cancer associated fibroblast

CAPS : Cryopyrin-associated
autoinflammatory syndromes

CAR-T : Chimeric antigen receptor T-cell

CARD : Caspase recruitment domain

CaSR : Calcium sensing receptors

CLIC : Chloride intracellular channels

CINCA : Chronic inflammatory neurological
cutaneous articular syndrome

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated
protein 4

DAMP/PAMP : Damage/pathogen-associated
molecular pattern

dMMR : deficient mismatch repair

EAE : Experimental autoimmune
encephalomyelitis

EGFR : Epithelial growth factor receptor

EMT : Transition épithéliomésenchymateuse

ERK : (Extracellular signal-regulated kinases)

FADD : Fas-associated protein with death
domain

FasL : Fas-ligand

FCAS : Familial cold autoinflammatory
syndrome

FoxP3 : Forkhead box P3

GSDM-D : gasdermine-D

GPRC6A : Récepteur couplé à une protéine
G 6A

HIF α : Hypoxia-inducible factor-1 alpha

ICD : Immunogenic cell death

ICI : Immune checkpoint inhibitors

IDO : Indoléamine 2-3 dioxygénase

IFN- γ : interferon-gamma

Ig : Immunoglobuline

ILC : Innate lymphoid cell

IRF : Interferon-regulatory factor

IRI : Lésions rénales d'ischémie-reperfusion

ITAM : Immunoreceptor-based activation
motif

ITGAE : Intégrine alpha-E

LPS : Lipopolysaccharide

LRR : Leucine-rich repeat

LAG-3 : Lymphocyte-activation gene 3

MARK4 : Microtubule-affinity regulating
kinase 4

MAVS : Protéines mitochondriales
détectrices antivirales

MDSC : Cellules myéloïdes suppressives

mIR : Micro-ARN

MMP : Métalloprotéases matricielles

(d)MMR : (deficient) mismatch repair

MSI/MSS : microsatellite instable/stable

mTORC1 : mammalian target of rapamycin
complex 1

MutL/MutS : MutL/S Homolog 2
MWS : Muckle-Wells syndrome
MYD88 : Myeloid differentiation primary response 88
N-GSDM-D : N-gasdermine-D
NACHT/NBD : Nucleotide binding domain
Nek7 : NIMA-related kinase 7
NF-κB : Nuclear factor-kappa B
NFAT5 : Nuclear factor of activated T cells
NK : Natural killer
NLR : NOD-like receptor
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NLRP3-AID : NLRP3-associated autoinflammatory disease
NOMID : Neonatal onset multisystem inflammatory disease
NOX : NADPH oxidase
OMS : Organisation mondiale de la santé
PD-(L)1 : Programmed cell death (ligand) protein 1
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PMS2 : (Postmeiotic Segregation Increased 2)
PRR : Pattern recognition receptor
PYD : Pyrin domain
RORγt : Retinoic acid receptor-related orphan receptor-γt
SAA : amyloïde A sérique
SCID : Severe Combined Immunodeficiency
SFPQ : Splicing factor, proline and glutamine-rich
SIRT2 : α-tubuline désacétylase sirtuine 2
SLEC/MPEC : Short live effector cells / memory precursor effector cells
SOCS3 : Suppressor of cytokine signaling-3
STAT : Signal Transducers and Activators
T-bet : T-box expressed in T cells
TAA : Tumor associated antigen

TAM : tumor associated macrophage
Th : T helper
TIL : tumor infiltrating lymphocytes
Tim-3 : T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3
TKI : Tyrosine kinase inhibitor
TLR : Toll Like receptor
TMB : Tumor mutational burden
TNF-α : Tumor necrosis factor alpha
Treg : T régulateur
TSA : Tumor-specific antigen
Tscm, cm, em, rm : T souches centraux mémoires, centraux mémoires, effecteurs mémoires, résidents mémoires
TWIK2 : Two-pore domain potassium channel 2
TXNIP : Thioredoxin-interacting protein
USP19 : Ubiquitin specific peptidase 19
VEGF : Vascular endothelial growth Factor

Introduction

Préambule

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde et la première en France selon la fondation pour la recherche contre le cancer, devant les maladies cardiovasculaires. Considérant les échecs thérapeutiques réguliers, le cancer est aujourd'hui un problème majeur de santé publique en termes de prises en charge et de traitements des patients. L'origine des cancers est difficile à établir, car il existe plusieurs composantes influençant son développement. Elles peuvent être héréditaires, c'est à dire liée à la génétique de l'individu ou bien environnementales, propres aux événements carcinogènes rencontrés au cours de la vie d'un individu, le sensibilisant au développement d'un cancer. Concernant la part environnementale, la prévention est un moyen efficace de lutter contre l'apparition de ces maladies en évitant les facteurs de risques connus. Il est considéré par l'OMS qu'un tiers des décès par cancers pourraient être évitables, car principalement dus à l'hygiène de vie, au travers du tabagisme, de l'alcool, ou du manque d'activités physiques. Bien que caractérisé par une croissance anormale et rapide des cellules d'un tissu, il est impropre de penser « le » cancer comme une seule et même maladie. Il s'agit en réalité d'un ensemble très hétérogène, rendant les stratégies de traitements uniques compliquées. Les traitements par agents chimiques toxiques, comme la chimiothérapie, ou par radiations sont restés pendant longtemps les seules armes pour lutter contre la progression de ces maladies, au prix parfois de lourds effets secondaires d'une efficacité limitée. Ce manque de solutions face aux cancers avancés a poussé la recherche à se focaliser sur le développement d'une médecine personnalisée disposant d'outils plus spécifiques, destinés à répondre à chaque situation individuellement.

L'un de ces outils consiste à utiliser le système immunitaire pour contrer le cancer. Dès 1905, Clowes et Baeslack montraient que des souris ayant guéri spontanément de tumeurs implantées n'étaient plus sensibles à la réinjection de la même souche néoplasique, supposant la possibilité d'une « vaccination » de ces souris contre les cellules tumorales. Une centaine d'années plus tard, le prix Nobel de médecine ou de physiologie est attribué au Dr. James P. Allison et au Pr. Tasuku Honjo pour leurs travaux consistant à la mise au point d'anticorps bloquants des récepteurs possédant une activité inhibitrice sur le système immunitaire. Ces thérapies ont révolutionné la prise en charge des cancers avancés de la peau, où la proportion de patients survivant plus de 5 ans à leur maladie a doublé. Moins toxiques que les chimiothérapies, ces inhibiteurs de point de contrôle sont actuellement couramment utilisés en clinique dans un grand nombre de cancers, comme les lymphomes, les cancers des poumons ou encore du côlon. Malheureusement, seulement un patient sur cinq tend à répondre à ce genre de thérapie. Cet échec s'explique par la nature de la tumeur, de son microenvironnement et de toutes les stratégies des cellules tumorales utilisées pour échapper ou détourner le système immunitaire. De fait, si les tumeurs ne sont pas infiltrées par les

cellules immunitaires ou que celles-ci sont pro-tumorales, alors un traitement par immunothérapie sera *de facto* inefficace, voire délétère. Ainsi, un des grands défis scientifiques actuels est d'améliorer la compréhension des interactions qui existent entre système immunitaire et cellules tumorales, afin de généraliser la réponse aux immunothérapies.

Ces interactions sont complexes à étudier, car elles impliquent de nombreux acteurs appartenant à l'immunité innée et adaptative. L'immunité innée est médiée par les barrières physiques comme la peau ou les muqueuses, les cellules de l'organisme, capables de se défendre contre les agressions et plus particulièrement les cellules de la lignée myéloïde, comme les macrophages ou les cellules dendritiques, spécialisés dans l'élimination des menaces. L'immunité adaptative, elle, fait intervenir des cellules de la lignée lymphoïde, parmi lesquelles figurent les lymphocytes T et B. Il est largement décrit aujourd'hui que l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes est un facteur pronostic important dans la survie des patients. C'est le cas par exemple des T CD4 auxiliaires (ou T helper, Th) dont le rôle ambivalent dans les tumeurs est de plus en plus étudié. Les Th17, un sous-type de cellules T CD4 caractérisées dans les années 2000, semblent particulièrement posséder cette ambivalence de fonction. Tantôt pro-inflammatoires et antitumorales et tantôt immunosuppresseurs et pro-tumorales, une des questions actuelles est de comprendre les signaux qui orientent cette différenciation vers un phénotype plutôt qu'un autre, dans le but d'éviter l'apparition de sous-types délétères et de promouvoir les sous-types bénéfiques. De manière similaire, il est de plus en plus décrit que les T CD8, lymphocytes inflammatoires et cytotoxiques, sont cruciaux dans la réponse aux immunothérapies mais qu'ils peuvent devenir dysfonctionnels dans un microenvironnement tumoral immunosuppresseur, voire exercer des fonctions immunosuppressives.

Ainsi, ces travaux de thèse s'inscrivent dans cette démarche d'amélioration des connaissances sur les interactions entre cancer et cellules immunitaires et plus précisément sur l'immunosuppression induite par le microenvironnement tumoral sur les lymphocytes Th17 et T CD8.

1. Impact du système immunitaire sur le développement des tumeurs

1.1. Découverte de l'immunosurveillance

Le concept d'immunosurveillance a été théorisé dans les années 50 et le postulat de départ était assez simpliste : l'immunité est responsable des rejets de greffes et les souris greffées avec des tumeurs de fonds génétiques différents sont aussi capables de rejeter les tumeurs implantées, supposant l'existence d'antigènes tumoraux capables d'être reconnus par le système immunitaire. Par la suite, il a été montré que les patients immunodéprimés étaient plus susceptibles de développer certains types de tumeurs. L'hypothèse était qu'en l'absence d'interactions avec le système immunitaire, certains types de tumeur pouvaient se développer plus facilement. Ces constats établissaient pour la première fois les bases de l'immunosurveillance antitumorale, à savoir la faculté par le système immunitaire de reconnaître les cellules tumorales¹. Au début des années 2000, Dunn *et al.*, ont proposé un

modèle en trois phases, appelé immunoédition, pour décrire les interactions entre le système immunitaire et les tumeurs². La première de ces phases correspond à la conséquence de l'immunosurveillance : les cellules immunitaires capables de reconnaître les cellules cancéreuses peuvent tuer les cellules tumorales, il s'agit de la phase d'élimination. Ensuite, il se forme un équilibre entre la prolifération des cellules tumorales et leur élimination. Lors de cette phase, les clones tumoraux sensibles à la réponse immunitaire se font éliminer petit à petit et les clones naturellement plus résistants et présents dans la tumeur survivent. La pression exercée par le système immunitaire façonne donc la tumeur par un phénomène de sélection naturelle conduisant à l'apparition de clones de plus en plus résistants à la réponse immunitaire. Cette phase, en apparence statique, est en réalité très dynamique et est appelée phase d'équilibre. Enfin, la stimulation chronique des cellules immunitaires entraîne leur dysfonction complète, elles ne se divisent plus, ne sécrètent plus de cytokines inflammatoires et expriment des récepteurs membranaires inhibiteurs qui répriment leur action, il s'agit alors de la phase d'échappement, symptomatique, dans laquelle le cancer n'est plus sous contrôle. Ainsi, ces trois phases conceptualisent l'évolution et la progression des tumeurs au sein d'un organisme immunocompétent.

1.2. Le façonnage des tumeurs par l'immunoédition

1.2.1. Préquel : origine génétique du cancer et fardeau mutationnel

Afin de comprendre comment le système immunitaire est capable de cibler et d'éliminer les cellules tumorales, il est important de définir le « pourquoi ». Bien qu'appartenant initialement à l'organisme, les cellules tumorales peuvent exprimer des antigènes capables de déclencher une réaction immunitaire. Lorsqu'ils sont présentés à leur membrane par les cellules tumorales sur leur complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), ils sont reconnus par les T CD8. Lorsqu'ils sont présentés à la membrane des cellules présentatrices d'antigène (CPA) à la suite de leur internalisation et de leur procession, sur leur CMH de classe II, ils sont reconnus par les T CD4. La présence de ces antigènes est consécutive à l'accumulation des mutations ayant conduit à la transformation progressive des cellules saines en cellules tumorales. Ces mutations peuvent être dues à l'héritage génétique ou à l'exposition à des agents physiques ou chimiques comme les radiations ultraviolettes, l'alcool ou le tabagisme. Parmi les événements cruciaux à l'origine de ces mutations (mutations aussi appelées fardeau mutationnel tumoral, ou TMB), on peut citer la déficience de la réparation des mésappariements de l'ADN (dMMR), responsable par exemple du syndrome de Lynch (cancers du côlon familiaux) et de l'apparition de cancers sporadiques. Les tumeurs issues de ce phénomène touchent principalement le tube digestif et l'endomètre. Dans les deux cas, ce sont des mutations dans les gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et/ou *PMS2* qui sont à l'origine du processus de cancérisation^{3,4}. En présence d'ATP, les protéines MSH2 (MutS Homolog 2) et MSH6 sont capables de s'associer en hétérodimère afin de reconnaître les mésappariements de base, tandis que l'hétérodimère composé des protéines MLH1 (MutL Homolog 1) et PMS2 (Postmeiotic Segregation Increased 2) permet le ré-appariement des bases nucléotidiques après avoir exercé son activité d'endonucléase⁵. La détection et/ou de la réparation des

mésappariements par le système MMR sont censées conduire au rétablissement d'un phénotype normal ou à la mort cellulaire, s'il y a trop de cassures. En son absence, les cellules saines ont une résistance accrue à l'apoptose et des instabilités dans leurs séquences d'ADN répétées en tandem, appelées instabilités microsatellites (MSI), qui favorisent l'apparition d'un phénotype tumoral⁶.

1.2.1.1. Néoantigènes et immunité

Ce TMB est à l'origine de l'apparition d'antigènes spécifiques des tumeurs, aussi appelés néoantigènes⁷. Ceux-ci sont exprimés uniquement par les cellules tumorales et sont appelés néoantigènes car leur séquence en acides aminés est modifiée en fonction des mutations présentes dans les cellules cancéreuses. Plus le TMB est grand, plus la probabilité d'expression par les tumeurs d'antigènes aberrants capables d'être reconnus par le système immunitaire, notamment les T CD8, est grande^{8,9}. Les néoantigènes sont particulièrement importants dans la réponse immunitaire spécifique dépendante des lymphocytes T¹⁰, en permettant leur activation par les CPA dans les ganglions drainants les tumeurs. Ils ne conduisent cependant pas systématiquement à une réponse immunitaire antitumorale ou à une réponse aux immunothérapies¹¹. Plus que le TMB, ce qui semble important est la capacité des néoantigènes à induire une réponse inflammatoire. L'inflammation est une réaction immédiate et non spécifique qui permet d'activer et de recruter les cellules immunitaires aux sites, afin de lutter contre les pathogènes et les cellules malignes. D'abord déclenchée par le système immunitaire inné, l'inflammation est ensuite amplifiée par les lymphocytes du système adaptatif. Après détection de signaux de dangers associés aux infections ou aux processus de cancérisation (détection de sucres composant la membrane bactérienne ou les néoantigènes, par exemple), les cellules du système immunitaire inné sont capables de sécréter des facteurs solubles modulant l'activité des cellules immunitaires, appelés cytokines ainsi que de présenter des antigènes sur leur CMH de classe II. L'interaction entre le complexe peptide/CMH II et le récepteur T (TCR) des lymphocytes dans les ganglions drainants le site tumoral ou infectieux, permet d'activer puis de recruter les cellules T assurant une action spécifique contre les cellules porteuses des antigènes qui leurs auront été présentés¹². Les facteurs influençant la qualité de ces néoantigènes sont très mal connus, mais il semblerait par exemple que plus un néoantigène possède de caractéristiques communes avec des antigènes du non-soi associés à un danger (comme ceux apparentés aux bactéries ou aux virus), plus celui-ci est susceptible de déclencher une réponse immunitaire¹³. Ainsi, le TMB n'est pas le seul paramètre à prendre en compte dans l'immunogénicité des cellules tumorales.

1.2.2. Equilibre et échappement

Lorsque la réponse immunitaire n'est pas suffisante pour éliminer la totalité des cellules tumorales, il s'opère alors un équilibre entre leur élimination et leur prolifération. Cet équilibre exerce une forte pression de sélection sur les cellules tumorales, favorisant l'émergence de clones tumoraux de plus en plus résistants à la réponse immunitaire, de la même manière qu'une population bactérienne s'adapterait à un antibiotique. Le façonnage qui a lieu durant cette phase est un processus lent et complexe, dépendant de la

reconnaissance des néoantigènes exprimés par les cellules tumorales, qui définissent en partie leur immunogénicité. Pour prouver ce phénomène, Rosenthal *et al.*, 2019, ont analysé l'exome (l'ensemble des exons), le transcriptome (par séquençage d'ARN) et l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes (TIL) (par histologie et transcriptomique) de 258 régions issues de 88 tumeurs de cancers bronchiques de patients encore non traités. Les auteurs ont montré deux choses : que le TMB (montré par le séquençage de l'exome) est bien relié à l'immunogénicité des tumeurs, mais que certaines mutations (notamment dans les régions codantes pour les gènes HLA, l'équivalent du CMH chez l'être humain) sont responsables d'un défaut d'infiltration des TIL à cause d'un défaut de présentation des antigènes par les cellules tumorales. Ensuite, ils ont montré que l'infiltrat en cellules immunitaires est hétérogène au sein d'une même tumeur et surtout qu'il est inversement proportionnel à l'hétérogénéité des cellules tumorales. Cela signifie que plus une région de la tumeur est infiltrée, plus les clones tumoraux présents sont homogènes et se ressemblent, car les clones moins résistants à la réponse immunitaire ont été éliminés. À l'inverse, une population hétérogène de cellules tumorales est associée à un faible infiltrat immunitaire¹⁴. Ces travaux ont été confirmés par Luksza *et al.*, 2022, qui ont comparé le profil des tumeurs de patients survivants peu ou plus longtemps à un cancer du pancréas. Ils ont montré notamment que les patients qui survivent le plus longtemps sont ceux qui expriment des néoantigènes immunogènes facilitant l'infiltration de la tumeur par les cellules T (notamment CD8) et que ces patients ont, de fait, une hétérogénéité tumorale diminuée. Par ailleurs, ils ont aussi confirmé que cette hétérogénéité diminuée allait de pair avec la disparition de l'expression des néoantigènes les plus immunogènes¹⁵. Ainsi, l'équilibre décrit précédemment évolue progressivement vers une situation où le système immunitaire devient incapable d'exercer des fonctions antitumorales, conduisant à la progression de la tumeur. Cette phase est appelée la phase d'échappement. Les trois « E » de l'immunoédition sont présentés en figure 1.

IMMUNOEDITING : les trois "E"

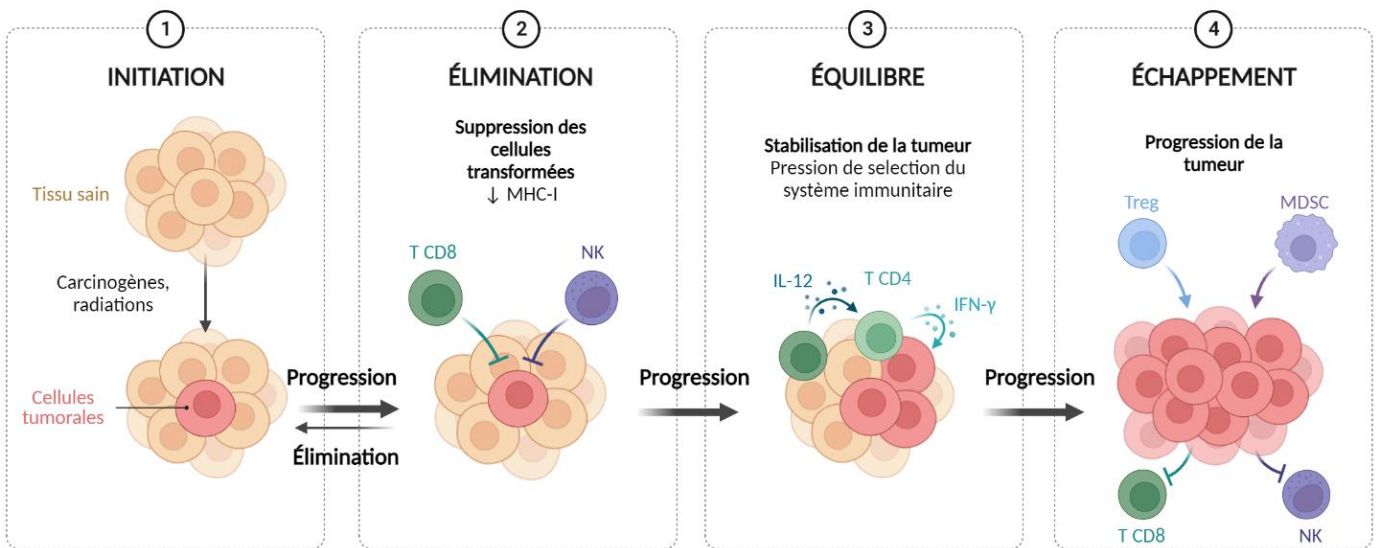


Figure 1 : Les trois « E » de l'immunoéditing. L'association des prédispositions génétiques et des agressions de l'environnement (carcinogènes, radiations) conduit au développement de mutations favorisant la survie et la prolifération anarchique des cellules constituant les premières étapes du processus de cancérisation, c'est l'initiation de la tumeur (1). Les cellules immunitaires innées et adaptatives sont capables de reconnaître les cellules tumorales, c'est la phase d'élimination (2). Parfois insuffisante pour éliminer les cellules tumorales, la pression exercée par la réponse immunitaire conduit à la sélection de clones tumoraux de plus en plus résistants à cette réponse. À ce stade, le cancer est encore asymptomatique : c'est la phase d'équilibre (3). Enfin, les clones résistants et le microenvironnement tumoral immunosuppresseur conduisent à la prolifération incontrôlée des cellules tumorales, conduisant à l'apparition d'une tumeur : c'est la phase d'échappement (4).

Malgré leur progression vers l'échappement, deux profils de tumeurs se distinguent : les tumeurs dites chaudes, exprimant des néoantigènes immunogènes, infiltrées par les cellules immunitaires et de bon pronostic pour les patients (perdant malgré tout leur immunogénicité au cours de l'immunoéditing) *versus* les tumeurs dites froides, qui sont peu immunogènes, peu infiltrées et de mauvais pronostic.

1.3. Tumeurs : entre inflammation et immunosuppression

Par le passé, la corrélation entre l'inflammation et le cancer a été suggérée par Rudolf Virchow, basé sur des observations selon lesquelles certains cancers provenaient de sites inflammatoires chroniques et étaient abondamment infiltrés par des cellules inflammatoires¹⁶. Depuis, il a été montré que l'inflammation extrinsèque, provoquée par des maladies auto-immunes, l'abus d'alcool ou le tabagisme contribuent à l'apparition de cancers¹⁷. Néanmoins, le rôle de l'inflammation aigüe présente aux sites tumoraux n'est pas encore complètement connue, car tous les processus inflammatoires ne sont pas unilatéralement antitumoraux. Bien qu'elle active le système immunitaire et qu'elle soit capable d'activer l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire, l'inflammation aigüe, mais surtout chronique, peuvent promouvoir la croissance, la migration des cellules tumorales, ainsi que la dysfonction du système immunitaire.

1.3.1. Inflammation : pro- ou antitumoral ?

Les signaux de dangers associés aux cellules tumorales sont capables de déclencher la sécrétion d'une cytokine appelée interleukine-1 β (IL-1 β) par les cellules du microenvironnement tumoral. Elle active les macrophages et permet leur différenciation en cellules M1 antitumorales, en plus de promouvoir la sécrétion par les Th1 (un sous-type de T CD4 inflammatoire de bon pronostic lorsqu'ils infiltreront les tumeurs) d'IL-2 et d'interféron-gamma (IFN- γ), des cytokines inflammatoires, dans des modèles *in vivo* de myélomes¹⁸ et de lymphome B¹⁹. Indirectement, l'IL-1 β est aussi capable de promouvoir la différenciation des T CD4 en Th9 en absence d'IL-2, par les facteurs de transcription NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et IRF1 (interferon regulatory factor 1), qui se fixent sur les promoteurs de l'*IL9* et l'*IL21*, cytokines possédant une activité antitumorale²⁰⁻²³. Cependant, l'IL-1 β possède un rôle ambivalent et est aussi associée à la progression de plusieurs cancers^{24,25}. Il a été montré dans des modèles d'organoïdes que l'IL-1 β est capable de stimuler à travers son récepteur, la voie TRAF6 et NF- κ B qui participe à la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales, en agissant sur la morphologie du cytosquelette²⁶. Ces résultats ont été ré-obtenus *in vitro* dans plusieurs autres contextes, où l'IL-1 β sécrétée par des macrophages est capable d'activer la voie de prolifération Wnt de cellules tumorales du colon²⁷ ou encore d'activer la prolifération *via* NF- κ B en inhibant cette fois le gène *PTEN*, suppresseur de tumeur régulant négativement la prolifération, en inhibant la voie de survie cellulaire dépendante de PI3K²⁸. De manière indirecte, Das *et al.*, 2020, ont montré par injection orthotopique dans des souris, que la croissance de cellules de cancer du pancréas KPC est plus lente chez les cellules *IL1r1*^{-/-29}.

Parmi les cytokines ciblant l'immunité, la fixation du facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) sur son récepteur (CSF2RA) induit l'activation de la tyrosine kinase JAK2, favorisant la survie des cellules cibles à travers son activation de STAT5 (Signal Transducers and Activators), ERK (Extracellular signal-regulated kinases) et la voie PI3K/Akt (Phosphoinositide 3-kinase/AKT)³⁰. Il est capable de cibler les cellules myéloïdes, lymphoïdes, endothéliales et cancéreuses et est lui-même sécrété par ces cellules en réponse à des signaux de danger³¹. Son rôle dans le cancer est également ambivalent car il promeut la

prolifération des cellules indifféremment de si celles-ci sont inflammatoires (Macrophage de type 1, lymphocytes T effecteurs) ou immunosuppressives (cellules myéloïdes suppressives ou MDSC, Macrophage de type 2 et T régulateurs) et son activité pro- ou antitumorale dépend donc du contexte dans lequel les cellules cibles reçoivent le signal, en combinaison avec d'autres cytokines³².

Le facteur nécrosant des tumeurs alpha (TNF- α) est une cytokine régulée par le facteur de transcription NF- κ B en réponse à de nombreux signaux, dont la sécrétion d'IL-1 β . Il est décrit comme capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales ou infectées par un pathogène afin d'éliminer la menace. Le TNF- α se lie à deux récepteurs, le TNFR1 et TNFR2. Si le premier est exprimé par la majorité des cellules de l'organisme ainsi que les cellules tumorales, le deuxième n'est exprimé que par les cellules immunitaires et les cellules endothéliales³³. Il est sécrété par les macrophages et les cellules T afin d'éliminer les menaces³⁴. Cette mort cellulaire est médiée par le récepteur TNFR1, capables d'activer la voie des caspases 8 et 3 *via* la protéine FADD (protéine avec domaine de mort associée à FAS) ou encore STAT1 et de déclencher la voie de l'apoptose extrinsèque par activation de la caspase 8³⁵. Dans leurs expériences, Kearney *et al.*, 2018, ont supprimé par la technique d'édition du génome (CRISPR-Cas9) une librairie de gènes dans des cellules de colon exprimant l'ovalbumine (MC38-OVA), puis ils les ont co-cultivé en présence de T CD8 spécifique de l'OVA (OT1). Se faisant, les auteurs ont montré que la perte de gènes impliqués dans la voie du TNF- α (perte du récepteur ainsi que de la caspase-8) conduit à une diminution de la sensibilité des cellules MC38 OVA aux T CD8 OT1. Ces résultats ont également été validés *in vivo* et chez d'autres types de cellules immunitaires³⁶. Malheureusement, l'inflammation chronique et la fixation du TNF- α sur le TNFR2 (TNFR Associated-Factor 2), anormalement exprimé par les cellules tumorales est aussi capable d'activer la formation de nouveaux vaisseaux sanguin par (appelée angiogenèse) par la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)³⁷, la prolifération des cellules tumorales par la voie RIP1, induisant NF- κ B mais aussi par la voie TRAF2 (TNFR Associated-Factor 2), activant les cascades de signalisation JAK, PI3K/AKT et MAPK³⁵ permettant la survie des cellules tumorales et une résistance accrue à l'apoptose. De plus, la sécrétion de TNF- α est aussi associée à la formation de métastases en fragilisant la matrice extracellulaire²⁶. Le TNF- α induit également le recrutement de cellules régulatrices comme les T CD4 régulateurs (Treg) et les MDSC, qui induisent l'immunosuppression par inhibition de contact ou par la sécrétion de cytokines immunosuppressives^{38,39}.

L'IFN- γ est semblable au TNF- α dans sa capacité à induire l'apoptose des cellules tumorales, mais son effet est transduit par la voie des STAT1/2 et l'activation des caspases 2/3⁴⁰. L'IFN- γ participe à l'activation des cellules immunitaires dépendantes des CPA en augmentant la présentation des néoantigènes par leur CMH I et en activant l'expression de CMH II chez les CPA^{41,42}. Il favorise aussi le recrutement, la différenciation et l'activation des T CD4 en Th1 antitumoraux, l'activation des T CD8 et leur recrutement⁴³. De plus, Overacre-Delgoffe *et al.*, 2017, ont montré que l'IFN- γ est capable de diminuer l'immunosuppression des Treg, dans des expériences de cocultures avec des cellules inflammatoires. Cette diminution de l'immunosuppression est cependant restaurée *in vivo* lorsque les Treg sont déficients pour le récepteur à l'IFN- γ ou lors de coculture en présence d'anticorps bloquants, anti-IFN- γ ⁴⁴.

L'inflammation chronique, médiée par l'IFN- γ a également pour conséquences l'apparition de mécanismes de rétrocontrôles négatifs, immunosuppresseurs, dont le rôle initial est d'empêcher un emballement de la réponse. Ainsi, il a été montré que de petites doses répétées d'IFN- γ attirent aussi des cellules immunosuppressives comme les MDSC ou les Treg⁴⁵ et induit l'apparition de ligands de points de contrôles immunitaires à la surface des cellules tumorales et du microenvironnement, comme PD-L1 (programmed death-ligand 1)⁴⁶ et Gal-9 (galectine-9)⁴⁷. Ces points de contrôle sont des récepteurs dont l'activation conduit au dysfonctionnement des cellules immunitaires et apparaissent lors de stimulation inflammatoires chroniques afin de limiter puis résoudre l'inflammation.

Il existe d'autres cytokines aux rôles ambivalents dans la réponse immunitaire antitumorale, comme l'IL-6 ou l'IL-4. Elles sont capables d'induire l'inflammation et sont importantes pour recruter et activer les cellules immunitaires, mais elles promeuvent aussi l'angiogenèse, les différenciations et l'activation de cellules régulatrices⁴⁸.

Ainsi, bien que l'inflammation au site des cancers possède un rôle antitumorale, les cellules tumorales peuvent aussi l'utiliser pour croître et se répandre dans l'organisme, une meilleure compréhension de ces mécanismes semble donc nécessaire afin de développer des thérapies ciblant les effets pro-tumoraux de l'inflammation.

1.3.2. Tumeurs froides : mécanismes d'immunosuppressions

Dans un contexte inflammatoire chronique, les cellules cancéreuses détournent des voies originellement impliquées dans la tolérance immunitaire (visant à éviter les maladies auto-immunes et l'emballement des réponses immunitaires), ce qui a pour conséquences de réduire l'activité des cellules effectrices Th1 ou T CD8, ainsi que leur recrutement.

Parmi les cellules immunosuppressives présentes dans les tumeurs, les Treg sont particulièrement importants, car régulièrement associés à un mauvais pronostic lorsqu'ils les infiltrent⁴⁹. Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques, responsables de la migration des cellules immunitaires lors de l'inflammation. Elles sont classées en 4 groupes, C, C-C, C-X-C et C-X3-C, en fonction de la disposition des résidus cystéine dans des sites très conservés inter-espèces. Les chimiokines C ont une seule cystéine N-terminale, les chimiokines C-C ont leurs cystéines adjacentes, les C-X-C ont un acide aminé entre et enfin les chimiokines de type CX3C possèdent trois acides aminés entre ses résidus cystéines. Leur récepteur est couplé à une protéine G, qui permet la transduction du signal et la mobilité des cellules⁵⁰. Les Treg sont sensibles aux chimiokines, CCL5, CCL22 et CCL28, sécrétées par les cellules du microenvironnement tumoral⁵¹⁻⁵³, ce qui induit leur recrutement. Initialement, le rôle des Treg est d'éviter l'auto-immunité et de protéger les tissus d'agressions par une inflammation trop forte ou chronique. Pour se différencier, ils ont besoin de la présentation d'antigène par les CPA au niveau de leur récepteur T (TCR), du signal de costimulation induit par l'interaction de CD80/CD86 présents sur les CPA et activant le récepteur CD28 sur les Treg⁵⁴, ainsi que des cytokines : le transforming growth-factor β (TGF- β) et l'IL-2⁵⁵. La stimulation du TCR induit l'expression du facteur de transcription signature des Treg, forkhead box P3 (FoxP3), mais

aussi NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), AP-1 (Activator protein-1) ou encore FOXO^{56,57}. Le TGF- β , quant à lui, induit FoxP3 en activant la voie de signalisation des SMAD (SMAD2/3). Il permet aussi l'acétylation de FoxP3, qui peut alors exercer son rôle de facteur de transcription. L'IL-2 est une cytokine activant la prolifération des cellules T, à travers la phosphorylation de STAT5 après s'être fixée sur son récepteur CD25. Chez les Treg, il s'agit d'un signal important pour l'expression de FoxP3. De plus, FoxP3 est capable de suractiver l'expression de CD25, ce qui induit une boucle de rétrocontrôle positif qui provoque la disparition de l'IL-2 disponible dans le milieu extra-cellulaire et participe donc à l'immunosuppression médiée par les Treg⁵⁸. Ce signal est possible grâce à l'inactivation de Socs3 par le TGF- β , antagoniste de la voie STAT-5⁵⁹. Plus qu'un activateur, FoxP3 agirait surtout en tant que répresseur de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire⁶⁰. Parmi les mécanismes immunosuppresseurs, les Treg expriment constitutivement des enzymes à leur surface, appelées des ectonucléotidases (CD39 et CD73)⁶¹. Leur effet immunosuppresseur passe par la dégradation d'ATP extracellulaire en ADP, puis en AMP, puis en adénosine. L'ATP faisant partie des signaux de dangers, son absence diminue l'activation des cellules avoisinantes. De plus, l'adénosine induit la sécrétion de VEGF et de CXCL12 par les cellules tumorales et les fibroblastes, promouvant l'angiogenèse et la formation de métastases (les cellules tumorales exprimant le récepteur de la chimiokine de CXCL12, CXCR4)⁶². CXCL12 induit également le recrutement des MDSC, la transdifférenciation des macrophages associés aux tumeurs en M2 pro-tumoraux et participe à la différenciation des T CD4 en Treg⁶³. Les Treg sécrètent aussi de l'IL-10, une cytokine immunosuppressive dont les mécanismes sont encore mal connus. L'IL-10 semble diminuer les fonctions et la sensibilité des CPA en étant antagoniste de la voie de l'IFN- γ et en réduisant l'expression du CMH II^{64,65}. Elle réduit également leurs capacités à être inflammatoires en agissant sur le métabolisme, réduisant les ROS intracellulaires des cellules myéloïdes, ce qui conduit à l'inhibition de la synthèse d'IL-1 β ⁶⁶. Les Treg peuvent aussi séquestrer par adhésions fortes les cellules myéloïdes, diminuant leur mobilité et leur disponibilité pour activer les autres cellules T. Chen *et al.*, 2017 ont montré par microscopie à force atomique que les Treg sont capables de se lier fortement aux CPA *via* l'interaction LFA-1/Icam lors de la présentation d'antigène sur leur CMH de classe II, afin d'éviter qu'elles n'aillent activer d'autres cellules immunitaires⁶⁷.

Le TGF- β est une cytokine qui fait partie d'une « superfamille », composée de plus de 30 protéines appartenant à plusieurs groupes, dont celui du TGF- β (1-3), des activines/inhibines (A et B) et des facteurs osseux morphogénétiques (1 à 20)⁶⁸. Le TGF- β est sécrété sous forme latente inactive en étant lié au peptide LAP (latency-associated peptide) et nécessite d'être activé avant de pouvoir se fixer sur son récepteur⁶⁹. Les intégrines qui l'activent sont des récepteurs exprimés à la surface des Treg et des cellules dendritiques ($\alpha\beta 8$ ⁷⁰) ou encore des cellules tumorales ou de l'intestin ($\alpha\beta 6$ ⁶⁹). Les métalloprotéases et les glycosidases présentes dans le microenvironnement tumoral sont également capables d'activer le TGF- β ⁷¹. Par la suite, le TGF- β se fixe sur son récepteur de type 2, appelé TGF β RII, qui recrute ensuite celui de type I afin de le phosphoryler, puis celui de type III qui agit en tant que co-récepteur, afin de former l'hétérotrimère fonctionnel⁷². Il est ensuite capable de phosphoryler les résidus sérines, thréonines et tyrosines afin de transduire son signal. Après fixation du TGF- β et la

phosphorylation de la sous-unité I par la sous-unité II, la sous-unité R1 phosphoryle les protéines SMAD2/3. En combinaison avec SMAD4, ces protéines transloquent au noyau afin de déclencher le programme transcriptionnel associé à la voie du TGF- β ^{73,74}. Bien que les protéines SMAD soient considérées comme les transducteurs « canoniques » de la voie du TGF- β , le récepteur au TGF- β est aussi capable d'activer d'autres voies associées à des kinases, comme les voies AKT, PI3K, mTOR, ERK, p38 ou encore des RHO GTPases^{75,76}. Cependant, la signalisation de ce récepteur peut aussi être due à la fixation de ses autres ligands, par exemple les activines ou les facteurs osseux morphogénétiques. Outre son effet dans la différenciation des Treg, le TGF- β possède un rôle immunosuppresseur direct. Dans les cellules Th1, Bernard *et al.*, 2021 ont décrit que le TGF- β est capable d'induire la production d'une isoforme courte du facteur de transcription IRF1, à travers le facteur d'épissage SFPQ (splicing factor, proline and glutamine-rich). Cette isoforme provoque une inhibition compétitive de la fixation d'IRF1 (courte *versus* longue) sur le promoteur du gène *Il12rb1*. Cette compétition entraîne une diminution de la quantité de récepteurs à l'IL-12 à la surface des cellules conduisant à une diminution du phénotype effecteur des Th1 (notamment en diminuant la sécrétion d'IFN- γ)⁷⁷. Les Treg sont également capables de séquestrer le TGF- β afin de le relarguer au moment pertinent, permettant la tolérance et la résolution de l'inflammation. Ce rôle dans la distribution spatiale du TGF- β leur confère, dans un contexte de cancer, un effet protumoral^{70,78,79}. Les Treg expriment également l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)⁸⁰ en présence d'IL-6, capable de convertir le tryptophane extracellulaire, en nicotinamide par la voie de synthèse de la kynurénine. Non seulement le tryptophane est important pour les cellules immunitaires, dont l'absence diminue l'activité cellulaire (diminution de la prolifération et de la survie *via* la voie mTORC1, pour mammalian target of rapamycin complex 1), mais les produits dérivés de son métabolisme sont des activateurs du facteur de transcription Ahr (aryl hydrocarbon receptor, d'abord décrit comme induit au contact d'agents xénobiotiques comme les dioxines et les polluants)⁸¹ mais qui est aussi connu pour activer la différenciation des T CD4 en T régulateurs et amplifier leur rôle immunosuppresseur⁸²⁻⁸⁴.

Outre les T CD4 régulateurs, il existe aussi des cellules T CD8 régulatrices, dont l'immunosuppression s'exprime par des récepteurs inhibiteurs de la réponse des cellules dendritiques. Ces cellules représentent néanmoins 0 à 3% des T CD8 chez un individu sain et leur différenciation ainsi que leurs rôles dans le cancer ne sont pas encore très clairs^{85,86}.

Les cellules T et les CPA expriment aussi des récepteurs inhibiteurs de la costimulation. Ces récepteurs ont pour but de réguler l'intensité de la réponse immunitaire et d'éviter l'auto-immunité. Ils permettent la résolution de l'inflammation lorsque le danger ayant activé le système immunitaire est éliminé. C'est le cas de CTLA-4, qui inhibe le récepteur de la costimulation du TCR, CD28. CTLA-4, exprimé par les Treg⁸⁷, possède une affinité plus importante pour CD28 que CD80 ou CD86, diminuant la disponibilité de CD28 et *de facto* l'activation des lymphocytes. L'absence de costimulation par CD28 entraîne en effet un défaut d'activation des cellules T, qui entrent alors en anergie. Cet état est provoqué par l'absence de costimulation (soit par absences des signaux, soit par inhibition). Les cellules dans cet état ont des capacités effectrices diminuées, voire absentes, ainsi qu'une prédisposition à

l'apoptose^{88,89}. De même, après stimulation aiguë, les cellules T effectrices expriment le point de contrôle immunosuppresseur PD-1 à leur surface, ce qui induit les premières étapes de la dysfonction des cellules T. La fixation des ligands de PD-1 (exprimé par les cellules T), à savoir PD-L1 et PD-L2 (exprimés par les cellules du microenvironnement tumoral) induit l'activation d'une phosphatase qui diminue l'activité de la kinase associée au TCR. Ainsi, leur interaction induit un défaut de stimulation des cellules par le TCR, conduisant à une diminution de l'activité inflammatoire (baisse de la sécrétion de cytokines) ou cytotoxique⁹⁰. Les cellules T expriment aussi d'autres récepteurs inhibiteurs, comme Tim-3, dont l'expression consécutive à PD-1 a été mise en lumière dans les T pour son rôle dans l'épuisement des lymphocytes lors d'infection virale chronique⁹¹. Depuis, il a été montré que l'immunosuppression de Tim-3 provient également de l'expression de ses ligands sur les CPA. En effet, Tim-3 possède plusieurs ligands, dont un exprimé par les cellules tumorales (la galectine-9) et deux lors de la mort des cellules (HMGB1 et la phosphatidylsérine)⁹². Lorsque Tim-3 est exprimé sur les CPA, sa liaison avec HMGB1 ou la phosphatidylsérine empêche l'endocytose d'ADN extracellulaire ou de corps apoptotiques, diminuant la réponse IFN et la sécrétion de CXCL9 et 10, chimiokines attirant les cellules T effectrices activées⁹³. Chez les T CD8, il a été montré que bien que les cellules résidentes présentes dans des cancers du côlon humain soient plus sujettes à sécréter de l'IFN- γ lorsqu'ils expriment Tim-3, environ la moitié d'entre eux sont en cours d'apoptose⁹⁴. Cette tendance a été confirmée *in vivo* chez la souris par injection de cellules de cancer du côlon (CT26) en sous-cutané, où les T CD8 infiltrant qui expriment Tim-3 sont en majorité positifs au marquage à l'annexine V, ciblant les phosphatidylsérine, dont la translocation au feuillet externe de la membrane cellulaire est un marqueur précoce de l'apoptose⁹⁴. Ces données expliquent pourquoi Tim-3 est considéré comme un marqueur de l'épuisement terminal des cellules T^{95,96}.

Les stratégies d'immunosuppression présentes dans le microenvironnement tumoral sont résumées en figure 2.

Immunosuppression du microenvironnement tumoral

Mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire

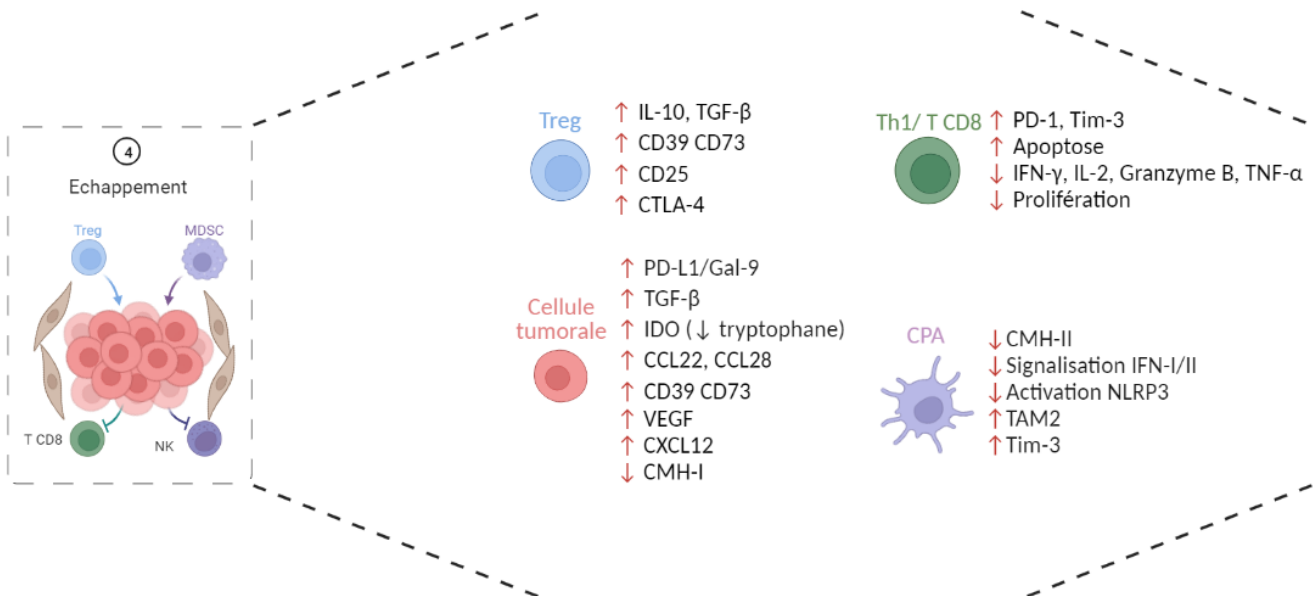


Figure 2 : Immunosuppressions du microenvironnement tumoral. Le microenvironnement tumoral est un environnement immunosuppresseur, capable de diminuer, voire de détourner l'action des cellules immunitaires afin de promouvoir la croissance des cellules tumorales. Il est par exemple capable d'induire les ligands des récepteurs inhibiteurs (PD-L1, Gal-9, etc.), de sécréter des molécules immunosuppressives (TGF- β , IL-10) et de recruter des cellules immunosuppressives (macrophages de type 2, Treg, MDSC).

2. Le paradoxe des lymphocytes Th17 : pro-ou anti-inflammatoires ?

2.1. Différenciation des lymphocytes Th17

L'activation des lymphocytes T CD4 est consécutive de la détection d'un signal de danger par le système immunitaire inné. Cette détection s'accompagne de signaux pro-inflammatoires provoquant la migration des cellules T CD4. Préalablement à cette migration, les lymphocytes T CD4 ont besoin d'être activés dans les ganglions les plus proches par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette activation nécessite trois signaux. Le premier d'entre eux est l'interaction entre le TCR de la cellule CD4 et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (CMH II) d'une CPA. Cette interaction est stabilisée par la fixation entre le récepteur CD4 et le domaine $\beta 2$ du CMH de type II. Il est estimé que les T CD4 naïfs d'une souris ont un répertoire TCR de 2.10^6 , chaque T CD4 exprimant un TCR unique⁹⁷. Ils sont donc capables de reconnaître des antigènes d'horizons variés, afin de garantir une réponse immunitaire polyvalente. Le complexe de reconnaissance de l'antigène est composé de deux entités distinctes, le récepteur TCR et le CD3. Après la reconnaissance du peptide présenté par le CMH II, les motifs d'activation des récepteurs immuns associés à la tyrosine (ITAM) de CD3 et de la chaîne zêta sont phosphorylés par la kinase Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase). Cette kinase est associée à la membrane plasmique des cellules T

sous forme inactive fermée, dont les domaines SH2 et SH3 interagissent avec une tyrosine phosphorylée (pY505). Cette tyrosine est phosphorylée par la kinase CSK et déphosphorylée par CD45. Cependant, CD45 est également capable de déphosphoryler une tyrosine activatrice primordiale de Lck, pY394, lui conférant une activité activatrice et inhibitrice de Lck. Du fait du haut niveau d'expression de CD45 à la membrane des lymphocytes inactivés (qui diminue lors de leur activation), il est considéré que CD45 est principalement inhibiteur de Lck. En effet, si de hauts niveaux d'expression de CD45 sont nécessaires pour déphosphoryler pY394 (inhibition de Lck), de faibles niveaux sont suffisants pour déphosphoryler pY505 (activation de Lck), activant Lck lors de la stimulation du TCR, qui peut alors autophosphoryler son domaine activateur, Y394^{98,99}. Par la suite, Lck conduit à la phosphorylation de CD3 et au recrutement de la kinase Zap70. CD3 et Zap70 promeuvent à leur tour le recrutement et l'activation de deux protéines adaptatrices proximales, LAT et SLP-76, capables de recruter à la membrane les enzymes transduisant le signal d'activation (notamment la phospholipase Cy1, dont le substrat, le PIP2, se trouve à la membrane). Deux voies générales se distinguent ensuite, celle du PIP2 et de la voie calcique, activant ERK et NFAT et celle des kinases, activant P38 et JNK. Ces voies aboutissent à la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire et la sécrétion d'IL-2¹⁰⁰. Le second signal nécessaire à l'activation d'un T CD4 est celui de la costimulation, médiée par CD28. Son rôle est d'amplifier le signal du TCR et d'éviter l'anergie en cas de signalisation trop faible. De la même manière que CD3, le récepteur CD28 est activé par phosphorylation *via* la kinase Lck. Cela conduit au recrutement de la kinase PI3K, qui convertit le PIP2 en PIP3 et recrute PDK1. PDK1 active ensuite un grand nombre de voies de signalisation comme NF- κ B, NFAT ou mTORC1, promouvant aussi la sécrétion d'IL-2, la survie, la prolifération cellulaire et le métabolisme glycolytique¹⁰¹. Enfin, le dernier signal d'activation est celui du signal cytokinique. Il dépend du contexte dans lequel les cellules évoluent et met en jeu un très grand nombre de récepteurs membranaires. Conjointement au signal TCR, le signal cytokinique permet la polarisation des lymphocytes T CD4 naïfs en un sous-type particulier. Mosmann *et al.*, ont découvert en 1986 par exemple que tous les T CD4 ne sécrétaient pas les mêmes facteurs solubles, appelés alors « lymphokines ». Cette hétérogénéité a ensuite conduit à s'interroger sur la pléiotropie des T CD4¹⁰².

Dans les années 2000, une population de T helper est identifiée dans un modèle de sclérose en plaque murine induite appelée EAE (pour Experimental autoimmune encephalomyelitis). À l'époque, les souris déficientes pour l'IFN- γ et son récepteur développaient des maladies aussi, voire plus intenses que leurs contrôles. De fait, le concept des Th1 pathogéniques semblait peu probable et a rapidement été remis en cause¹⁰³. Peu de temps après ce constat, Cua *et al.*, ont montré qu'un sous-type de T CD4 était amplifié par l'IL-23 et qu'il produisait de l'IL-17¹⁰⁴. Étant donné leur rôle unique et caractérisé, il a été proposé que cette sous-population soit appelée Th17, de par leur sécrétion d'IL-17A et F^{105,106}. Pour se différencier, les Th17 ont besoin d'IL-23, qui stabilise leur phénotype, mais ils peuvent aussi se différencier en présence de TGF- β et des cytokines inflammatoires IL-6 ou IL-1 β , suivant le contexte inflammatoire ou immunosuppresseur dans lequel ils évoluent. Ce signal inflammatoire induit l'expression de STAT3, capable d'induire le facteur de transcription principal à l'origine de leur différenciation en Th17, appelé retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t (ROR γ t). ROR γ t participe

conjointement avec STAT3/4 et Blimp-1 à l'induction de l'IL-17. De plus, ils promeuvent le phénotype inflammatoire des Th17 en inhibant l'expression de FoxP3, de l'IL-2 et Bcl6¹⁰⁷⁻¹¹⁰. En effet, il a été montré que l'IL-1 β favorise la différenciation des T CD4 naïfs en Th17 en activant l'épissage alternatif de FoxP3, facteur de transcription à la base de la différenciation des Treg⁵⁶. Son isoforme n'est pas capable d'induire la polarisation en Treg, mais elle favorise en revanche le phénotype Th17. Les auteurs ont par ailleurs montré dans des biopsies de colon de patients atteints de la maladie de Crohn, que l'isoforme alternative de FoxP3 est corrélée avec l'expression de l'IL-17¹¹¹.

Les Th17 occupent une place importante dans l'immunité des muqueuses. Par exemple, Ivanov *et al.*, 2009 ont montré que la présence de certains groupes de bactéries filamenteuses segmentées (SFB) sont capables d'induire la différenciation de T CD4 en Th17 exprimant ROR γ t et sécrétant de l'IL-17¹¹². Par la suite, il a été montré que la reconnaissance de certaines bactéries de ce groupe par les cellules dendritiques entraîne une sécrétion d'IL-23 et d'IL-22, favorisant la différenciation des T CD4 en Th17^{113,114}. L'équipe de Dan R. Littman a montré que ces cytokines sont induites par la sécrétion d'amyloïde sérique A (SAA, une protéine responsable de réponses inflammatoires aiguës) par les cellules épithéliales intestinales en réponse à ces bactéries¹¹⁵. Ils ont montré que le SAA est capable d'induire l'expression de ROR γ t et de l'IL-17 chez des Th17 humains différenciés *in vitro* et qu'*in vivo*, l'absence de SAA diminue la pathogénicité des Th17 dans des modèles de colites et d'EAE induites. De plus, la sécrétion par les Th17 d'IL-22, de GM-CSF et d'IL-17 permet le recrutement et l'activation des cellules neutrophiles ainsi que la sécrétion d'IgA, importantes dans la lutte contre les champignons, les parasites et les bactéries extracellulaires potentiellement présents dans la flore intestinale¹¹⁶. En revanche, les cellules Th17 régulatrices sont capables *a contrario* de diminuer la concentration en IgA dans les muqueuses intestinales et de promouvoir la tolérance afin d'éviter l'inflammation intestinal, en sécrétant du TGF- β ou de l'IL-10¹¹⁷.

2.2. Plasticité : le paradoxe des Th17

Nous avons vu que les Th17 se différencient en présence de deux type cytokines à première vue antagoniste : l'une inflammatoire (l'IL-1 β , IL-6) et l'autre anti-inflammatoire (TGF- β). Dans cette dualité, l'IL-21 joue un rôle important, car sa sécrétion autocrine en réponse à l'IL-6¹¹⁸ permet l'induction d'une boucle de rétrocontrôle positive, induisant l'expression de ROR γ t, indépendamment de la présence de TGF- β ¹¹⁹. En plus de STAT3 (réprimant FoxP3), l'IL-6 est aussi capable d'induire la voie STAT1, orientant le phénotype des Th17 vers un profil inflammatoire : les Th17i¹²⁰. Cependant, ROR γ t est paradoxalement capable de réprimer *Tbx21*, codant T-bet, facteur de transcription impliqué dans la différenciation en Th1 inflammatoire sécréteur d'IFN- γ ¹²¹. Outre l'IL-6 et le TGF- β , l'IL-23 semble posséder un rôle ambigu, représentatif de la dualité présente dans les Th17. L'IL-23 est capable d'induire T-bet et STAT-4, conduisant à la sécrétion d'IL-17 et d'IFN- γ ^{122,123}, mais aussi de Ahr, impliqué dans l'immunosuppression en favorisant l'expression de FoxP3 et STAT5⁵⁰. L'IL-1 β participe quant à elle à l'induction des Th17i, en réprimant SOCS3 et FoxP3 par l'IL-2 et pSTAT5, entraînant une balance pSTAT3/pSTAT5 en faveur de l'inflammation¹²⁴. Santarlasci *et al.*, 2009, ont décrit le TGF- β comme facultatif dans la différenciation des Th17

humains, avec une sécrétion d'IL-17 similaire entre des T CD4 différenciés en présence ou non de TGF- β . En revanche, ils ont montré que ces Th17 avait une expression de T-bet diminuée et qu'ils étaient moins capables de sécréter de l'IFN- γ , supportant l'hypothèse d'un rôle immunosuppresseur du TGF- β impliqué dans la génération de Th17¹²⁵. Par la suite, il a été décrit que le TGF- β est capable d'inhiber la différenciation en Th17 inflammatoires en induisant la phosphorylation de SMAD3, qui est capable de séquestrer ROR γ t et d'inhiber la sécrétion d'IL-17¹²⁶. Trim33, une ubiquitine ligase, est capable de son côté de moduler l'activité de la voie SMAD2/SMAD4. En effet, Tanaka *et al.*, 2018 ont montré dans un modèle d'EAE que l'absence de Trim33 dans les T CD4 favorise le phénotype anti-inflammatoire des Th17, produisant moins d'IFN- γ , d'IL-17 et plus d'IL-10 sans pour autant influencer les population des Treg¹²⁷. Trim33 permet d'induire la transcription des gènes codant pour l'IL-17 et bloque la transcription de l'IL-10 en altérant l'accessibilité de la chromatine de ses promoteurs, en modulant le degré de méthylation des histones. De plus, Trim33 est aussi capable d'agir directement, soit en tant que facteur de transcription s'associant à ROR γ t et SMAD2 pour induire l'IL-17, soit en réduisant l'expression de SMAD4 afin d'inhiber la voie de l'IL-10¹²⁷. De plus, lorsque le TGF- β induit SMAD2, sa coopération avec STAT-3 et la voie de l'IL-6 semble capable de synergiser avec ROR γ t. En effet, Yoon *et al.*, 2015, ont montré que l'absence de SMAD3 dans les T CD4 améliorerait le phénotype des souris atteintes d'arthrite (dont les lésions sont dépendantes des Th17) tandis que l'absence de SMAD2 l'aggravait¹²⁸. Cet effet s'explique par la coopération de STAT3 avec SMAD2 dans l'induction de l'IL-17, où la fixation de SMAD2 permet d'ouvrir la chromatine par acétylation de l'histone H3 et la triméthylation du motif histone H3K4¹²⁸. Ainsi, la voie du TGF- β est impliquée dans la régulation du phénotype des Th17 mais possède des effets antagonistes suivant la voie de signalisation cellulaire mobilisée. Outre l'IL-17, le TGF- β est capable d'induire la sécrétion d'IL-10 chez les Th17¹²⁹ et son absence ou son inhibition par SMAD7¹³⁰ peuvent être responsables de l'apparition de Th17 inflammatoire auto-immun¹³¹. Le TGF- β est également responsable de l'expression des ectonucléotidases immunosuppressives chez les Th17¹³². La signalisation du TGF- β dans les Th17 est présentée figure 3.

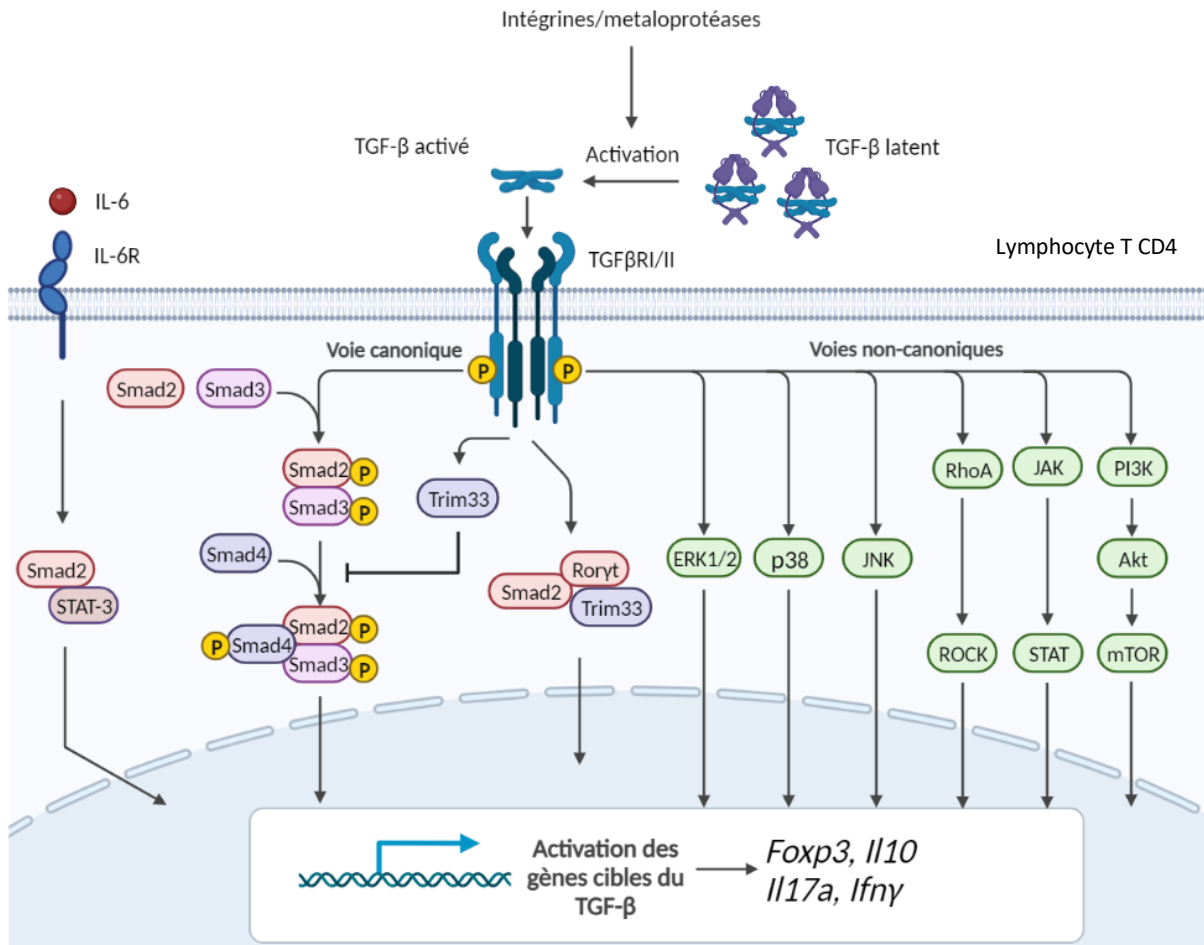


Figure 3 : Signalisation du TGF-β au sein des Th17. L'activation du TGF-β par les métalloprotéases et les intégrines lui permet de se fixer sur le récepteur TGFβRII, qui recrute alors le TGFβRI. Le signal peut alors être transduit soit par la voie canonique des SMAD, soit par d'autres voies non-canoniques (Erk, P38 AKT, etc.). La voie des SMAD est impliquée dans l'expression de FoxP3 et de l'IL-10 chez les Th17, tandis que la voie de l'IL-6 (STAT3) et Trim33 participent conjointement avec Rorγt au maintien du phénotype Th17 la sécrétion d'IL-17a. Cette coopération confère aux T CD4 un phénotype de Th17 possédant un phénotype régulateur.

Outre l'activité transcriptionnelle des STAT et des SMAD, IRF4 et BATF semblent jouer un rôle primordial dans la différenciation des Th17. En effet, il a été montré dans un modèle d'EAE que les T CD4 de souris *Irf4*^{-/-} exposés à de l'IL-6 et du TGF-β expriment beaucoup moins RORγt et sont moins sensibles à l'EAE¹³³. En parallèle, l'absence de BATF provoque le même phénotype avec une diminution de l'expression de l'IL-17 par Th17, non compensée par la présence de RORγt¹³⁴. Cet effet similaire s'explique par l'interaction entre BATF et IRF4, dont le complexe est capable de se fixer sur le promoteur des gènes codant pour les différentes isoformes de l'IL-17¹³⁵. La présence de ce complexe dans les Th0 laisse penser qu'ils exercent leurs actions de manière précoce, ouvrant la voie aux autres facteurs de transcription induits par le contexte cytokinique, comme RORγt ou FoxP3¹³⁶. Dans les facteurs de transcription impliqués dans la capacité d'adaptabilité des Th17, on peut citer aussi Runx1, qui interagit de manière compétitive avec des facteurs pro- ou anti-inflammatoires, comme FoxP3 et RORγt.

De fait, Runx1 est donc capable de faire pencher la balance d'un côté ou de l'autre, en fonction de l'environnement¹³⁷. Outre les signaux cytokiniques, le métabolisme des Th17 joue un rôle important dans la balance Th17r/i. CD5L par exemple, est impliqué dans la synthèse des lipides et si la production des acides gras s'oriente vers des acides gras saturés ou poly-insaturés, les Th17 peuvent s'orienter respectivement vers un profil Th17i ou Th17r¹³⁸. De même, lorsque l'activité glycolytique augmente lors de leur activation et sous l'action d'une enzyme du métabolisme glucidique (GPI-1), la voie c-Rel peut s'activer et orienter les Th17 vers un profil inflammatoire¹³⁹. Bien que les deux sous-types expriment l'IL-17 et le récepteur aux chimiokines CCR6, les Th17 inflammatoires ont un phénotype plus proches des Th1. En effet, ils sont sécrétors d'IFN- γ , de TNF- α , de GM-CSF et expriment le récepteur CXCR3¹⁴⁰, tandis que les Th17 régulateurs se rapprochent des Treg, sécrétors de TGF- β , d'IL-10 et exprimant les ectonucléotidases CD39 et CD73¹⁴¹. Les deux sous type de Th17 sont présentés en figure 4.

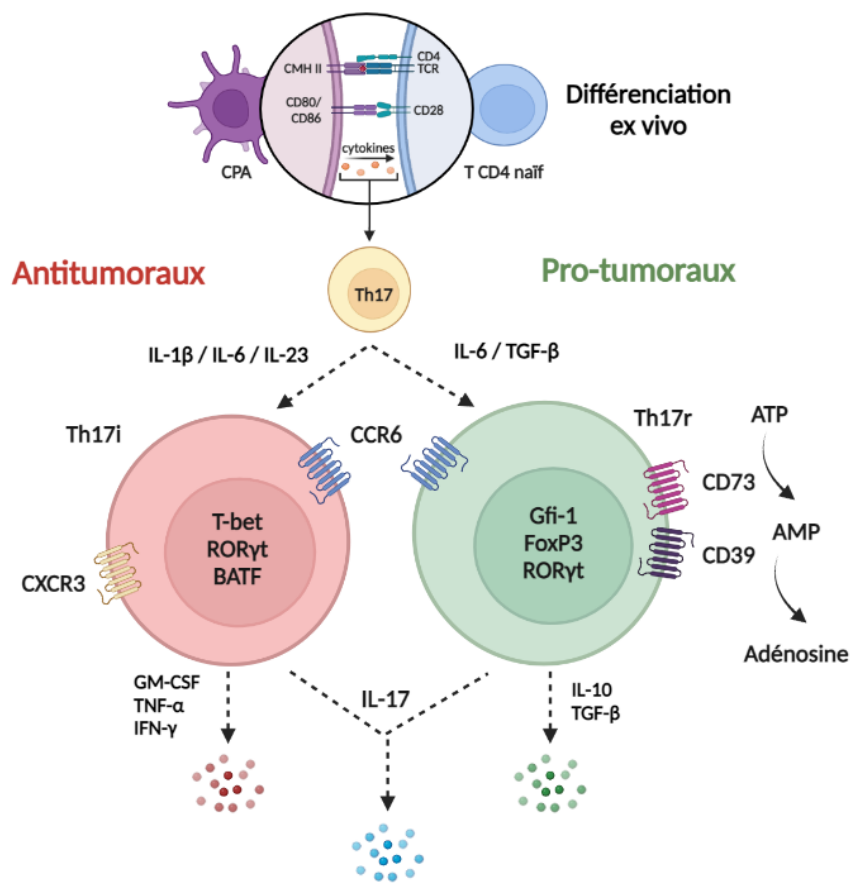


Figure 4 : Dualité entre Th17 inflammatoires et Th17 régulateurs. Les lymphocytes T CD4 naïfs sont plastiques et influencés par leur environnement. En présence d'IL-6 et de TGF- β dans leur milieu, les Th17 semblent se différencier en cellules régulatrices immunosuppressives. A l'inverse, un environnement inflammatoire conduit à leur différenciation en cellules inflammatoires, capables de sécréter des cytokines activant le système immunitaire, comme l'IFN- γ ou le GM-CSF. Les deux sous-types expriment des facteurs de transcription différents capables d'orienter leur programme transcriptionnel dans l'un ou l'autre des profils.

2.3. Impact des Th17 sur l'immunité antitumorale

Les Th17 ayant un profil ambivalent, il est difficile d'établir un rôle clair dans le cancer. Dans les cancers, l'impact des Th17 est dû à leur profil sécrétoire. L'IL-17 sécrétée en réponse à leur activation est capable d'induire la croissance des cellules tumorales et son expression est corrélée au développement de nombreux cancers¹⁴². Son expression est aussi corrélée avec un mauvais pronostic des patients atteints de tumeurs du côlon¹⁴³, où il est soupçonné que l'IL-17 soit associée à la production de VEGF par les cellules innées et tumorales, favorisant la perfusion des tumeurs¹⁴⁴. Ces résultats ont été retrouvés chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules¹⁴⁵ et ceux atteints de carcinome hépatocellulaire¹⁴⁶. A l'inverse, il a été montré que le taux de survie à cinq ans chez les patients atteints d'adénocarcinome gastrique qui présentent une expression accrue de l'IL-17 est significativement plus élevé que chez les patients présentant une expression d'IL-17 plus faible¹⁴⁷. De même, l'IL-17 semble aussi aider au recrutement et à l'activation des NK et des T CD8 dans des cancers ovariens et œsophagiens. Dans ces cancers, la présence d'IL-17 est fortement corrélée avec la présence de T CD4 sécréteurs d'IFN- γ ^{148,149}. Nous avons déjà exploré précédemment l'importance de la sécrétion de l'IFN- γ et du TNF- α dans la réponse immunitaire antitumorale, associées au profil Th17i ainsi que celle de l'IL-10, du TGF- β et des ectonucléotidases dans la croissance des tumeurs, associées aux cellules régulatrices comme les Th17r.

Afin de potentialiser les effets des thérapies contre le cancer, il est important de comprendre l'établissement des fonctions immunosuppressives des Th17 afin d'orienter la différenciation des Th17 vers un profil inflammatoire plutôt qu'immunosuppresseur.

3. Les lymphocytes T CD8 : acteurs majeurs de la réponse antitumorale

3.1. Un groupe moins homogène qu'il n'y paraît

3.1.1. Activation

Le rôle des T CD8 est d'éliminer les cellules qui seraient infectées par un pathogène ou malignes dans un contexte de cancer. Les cellules naïves, d'abord circulantes, sont activées dans les ganglions drainant le lieu de l'infection et/ou de la tumeur par CPA. Les T CD8 sont spécifiques d'un antigène et ont besoin pour s'activer de trois signaux, identiques à ceux présentés dans l'activation des Th17, à la différence que les T CD8 interagissent avec le CMH de type I pour s'arrimer à la cellule qui leur présente l'antigène. Bien que la plupart des cellules de l'organisme expriment le CMH de type I, les cellules T CD8 ont malgré tout besoin de signaux de costimulation et d'un environnement cytokinique favorable à leur activation. Par rapport aux T CD4, les T CD8 s'activent plus vite et produisent plus de cytokines effectrices. Ils sécrètent notamment plus des cytokines inflammatoires (IFN- γ , TNF- α) et sont plus cytotoxiques (par la sécrétion de Granzyme B, de perforine et l'expression des récepteurs de mort Fas)¹⁵⁰. Les lymphocytes T CD8 naïfs sont présents dans la rate, les ganglions et la circulation sanguine. Ils expriment les récepteurs aux chimiokines leur permettant de migrer dans les organes lymphoïdes, comme CCR7, qui reconnaît les chimiokines CCL19 et CCL21, produites par les cellules dendritiques ganglionnaires, ou CD62L qui reconnaît les protéines

GlyCAM-1 à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, permettant leur circulation dans l'organisme¹⁵¹. Après activation, les T CD8 perdent l'expression de CCR7 et CD62L afin d'éviter leur recirculation dans les organes lymphoïdes. A l'état basal, ils expriment la sous-unité de basse affinité du récepteur à l'IL-2, CD25, puis les deux sous-unités de haute affinité CD122 et CD132 lors de leur activation. Celles-ci sont nécessaires à leur expansion clonale et à leur différenciation en cellules effectrices¹⁵²⁻¹⁵⁴. Elles expriment ensuite les récepteurs aux chimiokines (comme CXCR3 ou CCR6) qui leurs permettent de migrer des ganglions jusqu'au site inflammatoire riches en chimiokines, où elles reçoivent d'autres signaux, influençant leur différenciation.

3.1.2. Différenciation

Contrairement aux T CD4, la différenciation des T CD8 est moins bien caractérisée. Un des modèles de différenciation des T CD8 actuel est celui de la différenciation asymétrique. Lorsqu'une cellule T CD8 reçoit les signaux d'activation, ceux-ci sont souvent polarisés, c'est-à-dire localisés d'un côté de la cellule. La cellule fille issue de la cellule activée a donc été stimulée « indirectement ». La cellule mère en contact avec la CPA deviendra alors la cellule effectrice à courte durée de vie (SLEC) et la cellule fille une cellule effectrice progénitrice mémoire (MPEC). Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène ne sont pas encore complètement établis, mais la division asymétrique semble cruciale dans l'établissement d'un « double phénotype » permettant, à partir d'une seule cellule, d'obtenir des cellules effectrices aiguës et des cellules mémoires pérennes¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Un des mécanismes proposés est par exemple la conservation d'une activité métabolique plus élevée dans les cellules T CD8 filles, notamment glycolytique, par transmission de la suractivité d'une kinase de la voie mTORC1^{158,159}. Chang *et al.*, 2014, expliquent que le profil SLEC est associé à un profil transcriptionnel particulier (expression de T-bet et STAT4), à un signal fort du TCR et à l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, 12 et IFN- γ). Les cellules MPEC, quant à elles, sont associées à un profil moins différencié (expression de facteurs de transcription de cellules souches, impliqués dans la prolifération et le renouvellement des cellules, comme TCF1), elles sont plus circulantes (expression de récepteurs aux chimiokines comme CXCR3) et moins effectrices (sécrétion uniquement d'IL-2 pour la prolifération)^{156,160,161}. Ainsi, la différence principale entre des T CD8 naïfs et des MPEC est leur capacité à se réactiver très vite après re-stimulation. Cette réactivation passe par des stades de différenciation intermédiaires. Le stade de cellules souches mémoires (Tscm) est controversé, du fait de la difficulté d'étudier les caractéristiques « souches » des cellules (qui possèdent peu de marqueurs discriminants). De plus, sa cohérence biologique dans un contexte d'activation rend le principe de « dédifférenciation totale » difficile à envisager pour les T CD8. Certains préfèrent parler directement de cellules centrales mémoires (Tcm), possédant des caractéristiques s'apparentant à celles de cellules souches, comme l'amplification clonale et la capacité à redonner une population de cellules effectrices à partir d'une seule cellule. Outre la prolifération, les Tcm expriment Eomes et TCF1, des facteurs de transcription impliqués dans la survie, la prolifération et l'inflammation. Ils sont aussi capables de recirculer dans les vaisseaux et de sécréter de l'IL-2. Elles peuvent sécréter des cytokines inflammatoires, mais en petite quantité. Si la stimulation persiste, les cellules Tcm se différencient en cellules

effectrices mémoires (Tem), à nouveau cytotoxiques, ne recirculant plus et exprimant CD69, T-bet et Blimp-1¹⁶². Enfin, les cellules MPEC peuvent se différencier en cellules résidentes mémoires (Trm) sous l'action du TGF- β , hautement inflammatoires et cytotoxiques, mais ne circulant que dans les tissus où elles se sont différenciées. Elles expriment CD69, CD103, ainsi que toutes les cytokines inflammatoires et les récepteurs de mort. CD69 et CD103 ont pour rôle d'arrimer les T résidents à la matrice extracellulaire afin d'éviter leur recirculation. Ils sont aussi capables d'activer les T CD8, CD103 participant à l'induction des capacités effectrices en induisant la sécrétion d'IFN- γ à travers les facteurs de transcription Notch et Runx3, qui activent aussi la dégranulation du granzyme B et de perforines¹⁶³. En se liant à l'E-cadhérine, CD103 permet aussi le maintien de la synapse immunologique en arrimant la cellule T CD8 à la cellule épithéliale ou tumorale qui l'exprime. L'infiltration et la différenciation en Trm sont directement reliées au pronostic des patients atteints de cancer. Ainsi, la présence de Trm garantit la sécrétion de cytokines inflammatoires et une réponse cytotoxique. Ces capacités sont associées à un meilleur pronostic dans les cancers urothéliaux, du côlon et du poumon¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. L'origine des Trm n'est pas forcément des Tem ou des Tcm¹⁶⁸. La différenciation des cellules T CD8 n'est pas un phénomène linéaire et les cellules sont capables de trans-différencier dans un sous-type plutôt qu'un autre. Bien que les populations de T CD8 soient plus homogènes que celles des T CD4, ils sont suffisamment plastiques pour s'adapter à leur environnement. Les Trm peuvent d'ailleurs subsister de nombreuses années après leur différenciation, notamment dans les muqueuses¹⁶⁹. La différenciation des T CD8 est résumée en figure 5.

Différenciation des lymphocytes T CD8 Origine des sous-types

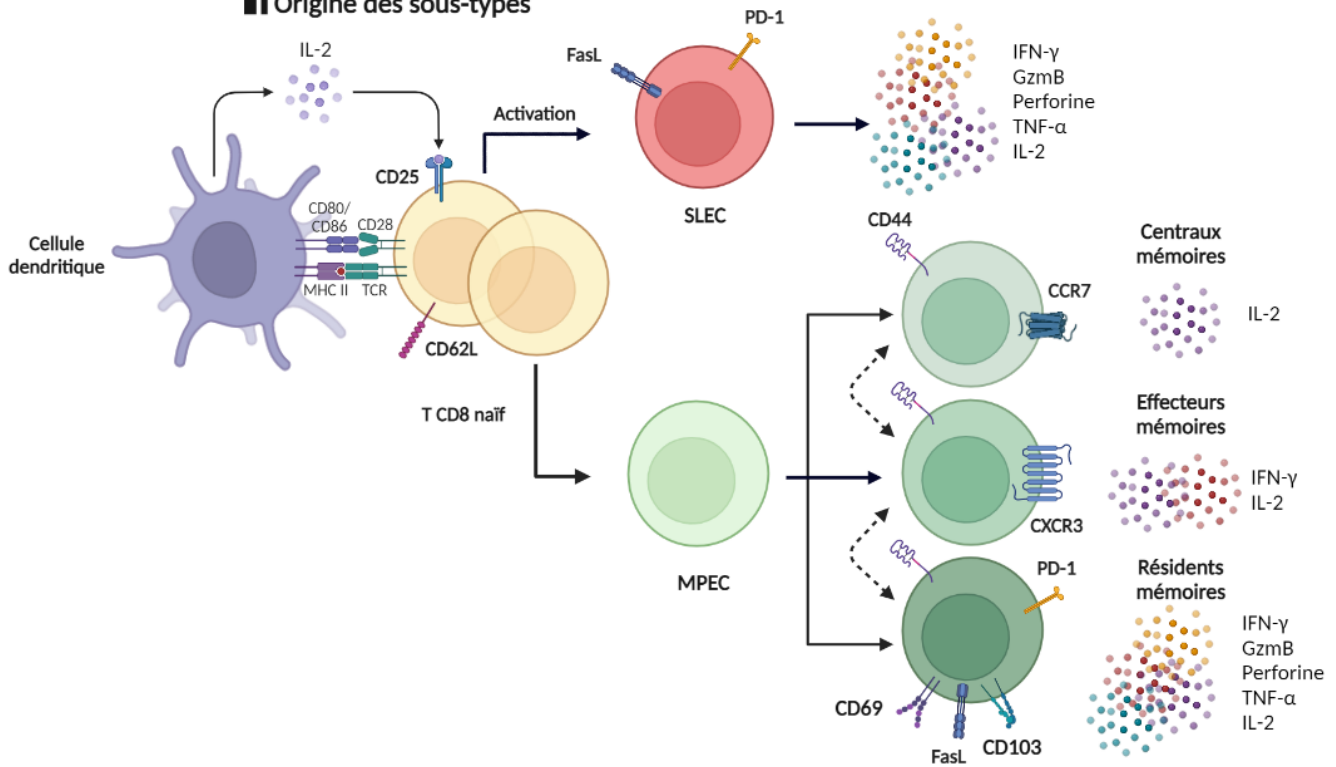


Figure 5 : Activation et différenciation des lymphocytes T CD8 : hypothèse de l'asymétrie. Après activation par une CPA et stimulation par l'IL-2, la cellule fille proximale se différencie en cellule à courte durée de vie (SLEC), très inflammatoire et cytotoxique. La cellule fille distale se différencie en cellule progénitrice mémoire (MPEC), dont le rôle après stimulation sera de se différencier rapidement en T effecteurs, transitionnant d'une cellule moins effectrice mais circulante et très proliférative (T centraux mémoires, Tcm) en un sous-type plus effecteur et moins circulant (T effecteurs mémoires) voire très effecteurs et ne circulant plus du tout (T résidents mémoires, Trm).

3.2. Lymphocytes T CD8 : des cellules antitumorales

3.2.1. Cytotoxicité et inflammation

La cytotoxicité des T CD8 s'exerce au niveau de la synapse immunologique, où a lieu l'interaction entre les cellules T CD8 et leurs cellules cibles. Là, les T CD8 peuvent sécréter des granules contenant des molécules cytotoxiques, formant des pores dans la membrane et induisant l'apoptose.

3.2.1.1. Granzyme B, perforine et granulysine

Les granzymes, la perforine et la granulysine sont un trio de protéines agissant de concert afin d'éliminer les cellules cibles des T CD8. La perforine est une glycoprotéine capable de former des pores dans la membrane plasmique en formant un polymère de 20 molécules de perforines. Présente dans des granules à l'intérieur des T CD8, la perforine est maintenue dans un état inactif globuleux par la calréticuline et a besoin pour s'activer et se polymériser

en présence de calcium, qui facilite aussi sa fixation à la membrane plasmique des cellules cibles^{170,171}. La formation de pores dans la membrane est parfois suffisante pour déclencher l'apoptose, du fait de la perturbation de l'équilibre osmotique qu'ils provoquent. La dégranulation est la conséquence directe de l'activation du TCR et de la cascade des kinases associées (MAPK, PI3K, etc.)¹⁷² ainsi que de la réorganisation des microtubules au sein des T CD8. De manière similaire, les molécules de granulysine provoquent aussi des pores dans la membrane plasmique, conduisant à un déséquilibre ionique provoqué par une augmentation du calcium intracellulaire et par la fuite de potassium. Ce déséquilibre provoque des dommages mitochondriaux, le relargage de cytochrome C, l'activation de caspases et *in fine*, l'apoptose¹⁷³. Par cette formation de pores, la perforine et la granulysine permettent également aux granzymes, protéases à sérines, d'entrer dans les cellules cibles et d'exercer leurs effets pro-apoptotiques. Parmi eux, le granzyme B est celle dont le rôle dans l'induction de l'apoptose est le plus décrit. Synthétisé sous forme inactive par les T CD8, le granzyme B est reconnu par le récepteur au mannose-6-phosphate, afin d'intégrer le compartiment lysosomal pour être excrété avec lui par exocytose¹⁷⁴. Concernant sa fonction, il a été montré il y a longtemps que l'absence de granzyme B diminue la capacité des cellules cytotoxiques d'induire l'activation des caspases et le clivage de l'ADN nucléaire¹⁷⁵. Le granzyme B active la voie intrinsèque de l'apoptose *via* BCL2, induisant le relargage de cytochrome C et de la protéine SMAC/DIABLO, conduisant à l'activation des caspases 3,7 et 9¹⁷⁶. Le granzyme A est quant à lui le granzyme le plus abondant¹⁷⁷, mais il active plutôt la production d'espèces réactives de l'oxygène par la mitochondrie (mtROS), qui ont pour conséquence la translocation du complexe protéique SET (composé d'exonucléases) du réticulum endoplasmique jusqu'au noyau, et de déclencher la mort de la cellule indépendamment des caspases¹⁷⁸. Afin de se protéger de leurs propres protéases, les cellules cytotoxiques expriment au moment de la dégranulation de fort taux de protéines inhibitrices appelées serpines¹⁷⁹. Il est intéressant de noter que le granzyme B peut être immunosuppresseur lorsqu'il est utilisé par les Treg pour tuer les lymphocytes T effecteurs. Ces fonctions sont d'ailleurs décrites comme participant à l'immunosuppression médiée par les Treg et favorisant la croissance tumorale^{180,181}.

3.2.1.1. TNF- α , Fas et TRAIL

L'équipe de Jürg Tschopp a montré dans les années 2000 que la fixation du TNF- α sur son récepteur, le TNFR1, conduit à la mise en place d'un complexe, composé du récepteur interagissant avec RIP1, TRAF2 et TRADD. Cette interaction induit la survie cellulaire et l'inflammation à travers IKK, qui par phosphorylation de I κ B permet l'activation de NF- κ B. Cependant, cette même fixation entraîne également l'internalisation d'une partie de ce complexe I, libérant les domaines de mort de TRADD et RIP1 formant le complexe II, capable d'activer les caspases et l'apoptose par recrutement du domaine FADD¹⁸². Ainsi, on retrouve cette ambiguïté de la voie du TNF dans la survie ou la mort de la cellule, dépendante de l'équilibre entre les forces du signal associé aux complexes I et II. Depuis, il a été montré que cet équilibre est souvent en faveur de la survie dans les cellules tumorales, notamment par des mutations chez les patients dans TRAF2, suractivant le complexe I et insensibilisant les cellules à l'apoptose médiée par le TNF- α ¹⁸³. Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation de

TRAF2 rétablit la sensibilité des cellules tumorales au TNF- α et restaure l'activité cytolytique des T CD8 dans un modèle d'interaction *in vitro* de mélanome humain et de T CD8 spécifiques¹⁸³. Ces résultats ont été reproduits *in vivo* dans des souris immunodéficientes NSG (NOD scid gamma) et immunocompétantes¹⁸³. Parmi les ligands des récepteurs de mort, TRAIL (pour TNF-related apoptosis-inducing ligand) et FAS-L (pour fas-ligand) fonctionnent de manière similaire au TNF- α : ils sont exprimés par les cellules immunitaires, mais aussi par les cellules tumorales (pouvant induire l'apoptose des cellules immunitaires) et induisent l'apoptose par la formation au niveau de leur récepteur d'une plate-forme pro-apoptotique appelée DISC (Death-inducing signaling complex), composée du domaine de mort du récepteur, lié à celui de FADD, lui-même lié à la capase-8 et induisant l'apoptose dépendante ou indépendante de la mitochondrie¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

3.2.1.2. L'IFN- γ

Outre leur cytotoxicité, les T CD8 ont aussi une activité inflammatoire importante par leur sécrétion de cytokines. Parmi elles, la voie de l'IFN- γ est fondamentale. Il est connu que les T CD8 expriment à la fois le récepteur à l'IFN- γ et l'IFN- γ . Dans un contexte d'infection virale, l'absence de ce récepteur diminue fortement l'amplification et l'activation des T CD8¹⁸⁷. Au sein du promoteur de l'*Ifng*, il existe plusieurs sites putatifs pour la fixation des facteurs de transcription NF- κ B, STAT, NFAT, T-bet et Eomes qui ont été largement décrits dans la production d'IFN- γ par les T CD8^{188,189}. NFAT est exprimé à la suite du signal TCR et de l'augmentation intracellulaire en Ca²⁺ qu'il provoque¹⁸⁸. T-bet et Eomes sont induits de manière similaire lors de l'activation de T CD8 dans un contexte inflammatoire et sont connus pour se fixer sur le promoteur de l'*Ifng* et au sein de régions régulatrices en amont¹⁸⁹. Dans un contexte inflammatoire, l'IL-12, à travers l'action de son récepteur, est capable d'amplifier la réponse inflammatoire des T CD8. Bien que le récepteur à l'IL-12 ne soit pas exprimé à l'état basal, il est induit par la stimulation du TCR¹⁹⁰ et possède un effet double. Par la voie STAT-4, il permet l'induction directe d'IFN- γ , mais permet aussi la déméthylation du promoteur du gène *Ifng* via l'enzyme TET2, permettant aux facteurs de transcription de s'y fixer^{191,192}. Il a été montré *in vitro* chez la souris que les T CD8 mémoires exprimant CD44 ont les îlots CpG du promoteur de l'*Ifng* plus accessibles (car moins méthylés) et qu'ils sont capables de produire très rapidement de fortes quantités d'IFN- γ ¹⁹³. L'IL-2, à travers STAT-5, est aussi capable d'induire la production d'IFN- γ par la promotion de T-bet et Eomes ou en ciblant directement le promoteur du gène, réprimant notamment l'immunosuppression du TGF- β ¹⁹². En outre, l'IFN- γ est associé à un profil effecteur des T CD8, en promouvant l'expression de son propre récepteur (induisant une boucle de rétrocontrôle positive facilitant leur activation) et du récepteur aux chimiokines CXCR3⁴⁵.

3.2.2. Recrutement des T CD8 par les tumeurs

En fonction des sous-types, les T CD8 expriment des récepteurs aux chimiokines différents. Ces récepteurs sont des senseurs des chimiokines, qui leur permettent de circuler en suivant la concentration croissante du gradient de ces protéines allant de la concentration la plus faible (circulation sanguine) aux concentrations les plus fortes (ganglions drainant et sites inflammatoires infectés ou tumoraux). Chez la souris, les T CD8 naïfs expriment CCR7,

ligand de CCL19 et CCL21 et CD62L une selectine capable de reconnaître les molécules de surfaces présentes dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques¹⁹⁴. CCL19 et 21 sont produits par les hauts veinules endothéliaux et par les organes lymphoïdes secondaires, permettant la circulation et le recrutement des cellules naïves dans les ganglions¹⁹⁴. Il a été montré lors d'infections virales, que la sécrétion d'IFN- γ est capable de réprimer CCR7 et d'amorcer la différenciation en cellules effectrices exprimant CXCR3¹⁹⁵. De manière intéressante, il a été montré que les cellules tumorales de sein et de mélanome sont capables d'exprimer CCR7 et de sécréter du CCL19 et du CCL21 afin de migrer, supposant un recrutement possible des cellules T CD8 naïves pouvant se différencier *in situ*¹⁹⁶ par reconnaissance des néoantigènes. Cependant, le recrutement de cellules T CD8 naïves peut induire l'anergie si le microenvironnement tumoral est immunosuppresseur, les cellules T CD8 ayant besoin des signaux de costimulation. CXCR3 quant à lui est exprimé par les cellules effectrices qui ont amorcé leur activation. Similairement à CCR7, les cellules tumorales peuvent exprimer CXCR3 et ses ligands¹⁹⁷. Après activation dans les ganglions avoisinant la tumeur, les T CD8 à courte durée de vie expriment CXCR3 et sont sensibles aux chimiokines CXCL9, 10 ou 11 sécrétées par la tumeur. Il a été montré *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de cancer de la peau que le recrutement des T CD8 exprimant CXCR3 par CXCL9 et 10 est nécessaire à la réponse immunitaire antitumorale et que le transfert adoptif de T CD8 CXCR3^{-/-} n'induit pas d'effets antitumoraux, contrairement aux T CD8 sauvages¹⁹⁸. CXCR3 est en effet largement décrit pour son rôle dans le recrutement de cellules effectrices et est fortement exprimé par les T CD8 infiltrant les cancers du sein, colorectaux et de la peau. Il existe d'autres récepteurs aux chimiokines exprimés par les T CD8, mais ceux-ci restent facultatifs pour leur infiltration. Néanmoins, il a été montré dans un contexte de radiothérapie que la surexpression de CXCL16 par les cellules tumorales est associée à une meilleure survie grâce à l'infiltration de T CD8 exprimant CXCR6. Les macrophages associés aux tumeurs sont aussi capables de recruter les T CD8 exprimant cette fois CX3CR1, par la sécrétion de CXCL1¹⁹⁹, mais le rôle de CX3CR1 reste encore ambigu dans la biologie des T CD8.

3.3. Limites de la réponse antitumorales des T CD8 : l'épuisement

Malgré leurs capacités antitumorales puissantes, les cellules T CD8 effectrices ou résidentes finissent par s'épuiser face aux stratégies d'échappement et d'immunosuppression mises en place par la tumeur. Ainsi, plutôt que de s'attarder à décrire des cellules effectrices, résidentes ou mémoires, qui ne sont plus très pertinentes dans le contexte d'un microenvironnement agressif pour les T CD8, certains auteurs se focalisent sur le degré de fonctionnalité des cellules infiltrant les tumeurs. Ainsi, il a été décrit que le processus par lequel les T CD8 deviennent dysfonctionnel est un phénomène progressif qui les conduit à l'inaction, voire la mort cellulaire. Dans un article ambitieux, Hudson *et al.*, 2019, ont comparé par séquençage d'ARNm, les populations de T CD8 dans deux modèles infectieux : le premier est celui d'infections aiguës de souris par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)-Armstrong et le second dans un modèle d'infection chronique par le LCMV-13. Leurs résultats ont montré que lorsque les cellules commencent à s'épuiser, elles expriment PD-1, le facteur de transcription TCF-1 (impliqué dans la prolifération et l'expansion clonale) et sécrètent des

cytokines inflammatoires comme l'IFN- γ ⁹⁵. Les cellules sont alors considérées comme épuisées progénitrices. Lorsque la stimulation se poursuit et que le microenvironnement est toujours hostile aux T CD8, ils expriment PD-1, Tim-3 et CX3CR1. Elles sont toujours inflammatoires, mais perdent petit à petit leurs capacités sécrétoires, de prolifération et de migration. C'est le stade transitoire épuisé. Enfin, lorsque les cellules expriment beaucoup de points de contrôle immunosuppresseurs (PD-1, Tim-3, LAG-3 et d'autres), les facteurs de transcriptions Tox, c-myc et le récepteur CD101 (impliqué dans la sénescence des cellules), qu'elles ne prolifèrent plus et ne sécrètent plus de cytokines, elles sont alors considérées comme épuisées terminales²⁰⁰. Leur programme transcriptionnel est court-circuité, les cellules ont perdu l'expression de TCF-1, de T-bet, de l'IFN- γ , du granzyme B et deviennent incapables d'être inflammatoires, de migrer et de proliférer.

Actuellement, la recherche essaie de répondre à plusieurs défis associés à l'immunothérapie : mettre en lumière les mécanismes d'épuisement des cellules afin de trouver un traitement le renversant, ainsi qu'essayer de comprendre quels sont les facteurs prédictifs de la réponse aux traitements qui permettraient de savoir à l'avance si l'administration d'une immunothérapie est pertinente ou non pour le patient^{201,202}.

4. Immunothérapies

4.1. Définitions

Les immunothérapies actuelles se déclinent en deux catégories : actives et passives. L'immunothérapie active se divise elle-même en deux catégories : non spécifique et spécifique. L'immunothérapie active non spécifique est une des plus anciennes immunothérapies : elle consiste à injecter directement des cytokines aux propriétés inflammatoires et/ou antitumorales. C'est le cas par exemple de l'IL-2, qui est une des premières cytokines à avoir été approuvée en tant qu'immunothérapie, d'abord dans le carcinome rénal métastatique, puis dans le mélanome métastatique^{203,204}. Cependant, du fait de son large spectre d'action sur les lymphocytes, ce genre de thérapie présente de gros risques de développer des effets secondaires graves, induisant de l'inflammation cérébrale et des chocs cytokiniques, pouvant conduire au décès du patient²⁰⁵.

L'immunothérapie active spécifique cherche quant à elle à cibler l'activation de la réponse immunitaire. Il s'agit par exemple de provoquer l'expression de signaux de danger par les cellules tumorales grâce à de la chimiothérapie, ou bien de mettre en place des stratégies vaccinales (autre que les vaccins dirigés contre les virus carcinogènes, type HPV ou hépatite B) visant à faciliter, voire provoquer, la présentation des néoantigènes tumoraux aux cellules T²⁰⁶. Dans cette catégorie se trouvent aussi les lymphocytes T spécifiques de patients et modifiés, possédant un récepteur T chimérique (CarT). Enfin, l'immunothérapie passive consiste à bloquer les cibles néfastes pour l'activation du système immunitaire pour qu'il puisse fonctionner correctement. Il s'agit des travaux qui ont conduit à la mise au point des inhibiteurs de point de contrôle (ICI), c'est-à-dire des anticorps bloquant les points de

contrôle du système immunitaire, afin de lever l'épuisement des cellules présentes dans le microenvironnement tumoral.

Ainsi, il se dégage 4 grands axes sur lesquelles l'immunothérapie est actuellement focalisée : cibler l'immunosuppression, activer la mort immunogène, induire la présentation d'antigènes et enfin activer les lymphocytes T effecteurs antitumoraux²⁰⁷.

4.2. Anticorps spécifiques et associations des thérapies

Les anticorps bloquant permettent d'empêcher l'interaction entre le récepteur inhibiteur et ses ligands, permettant ainsi d'empêcher leurs effets immunosuppresseurs décrits précédemment pour PD-1 ou Tim-3. Dans les cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC) l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales est récemment devenue un outil utilisé pour déterminer une stratégie thérapeutique. Ainsi, les anticorps anti-PD1 (Nivolumab, Pembrolizumab) sont actuellement utilisés en première ligne dans le traitement des NSCLC exprimant PD-L1, après de nombreuses études démontrant leur efficacité seule, ou en association avec d'autres thérapies, allant jusqu'à doubler la proportion de patients survivant plus d'un an, sans progression de la maladie^{208,209}. De plus, l'étude locale IMMUNOPREDICT, ancillaire au programme EXOMA, a permis de montrer l'intérêt du Nivolumab en seconde ligne par rapport à une chimiothérapie classique²¹⁰. Dans les cancers colorectaux, les anti-PD-1 ont montré une bonne efficacité chez les patients atteints de cancers MSI ou MSS avec un TMB élevé, mais aucune efficacité dans les tumeurs MSS (représentant hélas environ 80% des tumeurs colorectales)²¹¹. Par rapport aux anti-PD-1, les anti-PD-L1 ont l'avantage de présenter moins d'effets secondaires, mais il a été montré que leur efficacité est réduite lorsqu'ils sont seuls ou associés à de la chimiothérapie dans les cancers bronchiques, du fait de l'expression par les cellules de PD-L2, second ligand de PD-1²¹². Les cytokines sécrétées dans le microenvironnement font parties des marqueurs de la réponse aux immunothérapies. Ainsi, lorsqu'il n'est pas sécrété par les Treg, le granzyme B est associé à une meilleure réponse aux anti-PD-L1 *in vitro*²¹³ et à la combinaison chimiothérapie/anti-PD-1 *in vivo*, chez des souris porteuses de tumeurs du colon²¹⁴. De plus, la sécrétion d'IFN- γ est régulièrement associée à de meilleures réponses des patients aux anti-PD-1 dans des cancers urothéliaux et du sein^{164,215}. Il a aussi été montré que l'état d'épuisement des cellules est important dans la réponse aux anticorps bloquant, les cellules épuisées progénitrices présentes dans les tumeurs ont été décrites comme répondant à l'immunothérapie et réactivables^{216,217}, tandis que les cellules épuisées terminales en sont incapables^{95,218}.

En se basant sur le rôle négatif de CTLA-4 sur l'activation des lymphocytes T à travers les Treg, l'interaction entre lui et CD80 est devenue une cible attrayante pour le développement d'anticorps bloquant. Des études chez la souris et chez l'homme ont démontré que le blocage de CTLA-4 annule l'immunosuppression induite par les Treg et favorise les fonctions effectrices des cellules T CD4 et CD8, notamment dans le mélanome, où l'anti CTLA-4 (Ipilimumab) a prouvé son efficacité en première ligne de traitement^{219,220}. Cependant, le nombre de patients répondeurs (notamment sur de longues durées, supérieure à 3 ans) reste faible (de l'ordre de 20%). Après une étude de phase III décevante sur l'utilisation seule des anti-CTLA-4 dans les

cancers bronchiques²²¹, de nouvelles stratégies ont dû être développées. Il s'agit notamment de l'association entre les anti-CTLA-4 et les anti-PD-1. Cette association a porté le nombre de patients répondeurs dans le mélanome à 60%²²². Cet effet s'explique par la synergie entre le blocage des Treg (par les anti-CTLA-4) et la réactivation des cellules effectrices (notamment T CD8) infiltrant les tumeurs (par l'anti-PD-1)²⁰⁷. Les anticorps bloquants anti-CTLA-4 se sont montrés également intéressants en combinaison avec d'autres traitements déjà existants, notamment la chimiothérapie, dans les cancers bronchiques²²³. Ils restent cependant peu utilisés, du fait de leur faible rapport bénéfices/risques.

De son côté, le blocage de Tim-3 possède un double intérêt : celui de réactiver les cellules T et d'améliorer la fonction des cellules présentatrices d'antigènes. Cependant, l'impact de Tim-3 dans l'épuisement n'est pas complètement clair et il a été montré dans des modèles d'infections chroniques au LMCV que son expression est utile dans l'expansion des cellules effectrices et la réactivation des cellules mémoires²²⁴. Ces données sont en accord avec l'absence de valeur pronostic de Tim-3 dans les cancers ainsi que l'inefficacité des thérapies ciblant Tim-3 seul. Cependant, il a été montré *in vivo* dans un modèle de cancer tête et cou murin dérivant du virus carcinogène HPV16 (fortement associé aux cancers tête et cou chez l'Homme) que la surexpression de Tim-3 médiée par la voie PI3K/Akt en réponse à des anti-PD-1 est capable d'induire une absence d'efficacité des anti-PD-1²²⁵. Les auteurs ont montré que l'inhibition chimique *in vitro* de la voie PI3K/Akt est capable de diminuer l'expression de Tim-3 chez les TIL de souris ayant reçu des anti-PD-1. Ils ne précisent cependant pas si cette inhibition pourrait être associée à une meilleure réponse aux anti-PD-1 *in vivo*. Ainsi, en association avec des anti-PD-1, les thérapies ciblant Tim-3 s'avèrent prometteuses et il a été montré dans un modèle de cancer du côlon murin CT26 que l'association d'anti PD-L1 avec des anti-Tim-3 est capable de drastiquement réduire la croissance des tumeurs et de restaurer l'expression de l'IFN- γ chez les CD8 TIL²²⁶. D'autres anticorps bloquant sont actuellement en cours de développement, comme les anticorps ciblant LAG-3 (lymphocyte-activation gene-3, exprimé par les Treg et bloquant l'interaction entre le CMH de type II et le TCR des T CD4, empêchant leur activation²²⁷). Ceux-ci ont montré de bons résultats dans les cancers colorectaux, mais les essais de phase III sont actuellement toujours en cours²²⁸

Plusieurs études cliniques et pré-cliniques ont montré que certaines chimiothérapies comme la gemcitabine, la doxorubicine, la bléomycine, le cyclophosphamide ou encore les sels de platine, sont capables d'activer le système immunitaire²²⁹. L'association des sels de platine et de l'immunothérapie est le standard dans la prise en charge du cancer des poumons, cependant les mécanismes de la synergie de ces deux traitements sont relativement peu connus²³⁰. Très récemment, plusieurs études montrent comment les chimiothérapies induisant une réaction immunitaire fonctionnent en association avec des immunothérapies. Dans le cas du cisplatine, dans un modèle de cancer du poumon murin TC1 réfractaire à l'immunothérapie, le traitement par chimiothérapie induit la sécrétion de la chimiokine CCL20 par les cellules tumorales. Cette chimiokine permet ensuite le recrutement de cellules immunitaires innées, qui, en sécrétant la chimiokine CXCL10, recrutent à leur tour les T CD8 cytotoxiques possédant le récepteur CXCR3 aux sites des tumeurs²³¹.

De la même manière, dans un modèle de tumeur du poumon murin LLC1 très peu immunogène injecté en sous-cutané, l'association du cisplatine avec le pemetrexed, un antinéoplasique, permet d'obtenir une réponse inflammatoire forte. Bien qu'aucune synergie avec les anti-PD-1 n'ait été observée, lorsque le cisplatine et le pemetrexed sont couplés avec un autre antinéoplasique, un inhibiteur de MEK, la combinaison des traitements induit la sécrétion de CXCL10 par les cellules tumorales. Elles deviennent alors capables de recruter les T CD8 et rendent ce modèle sensible aux anticorps bloquant²³². Il également a été montré que le cisplatine peut synergiser avec des anti-PD-1 dans un modèle murin de cancer tête et cou, où il améliore la présentation d'antigène par les CPA, mais augmente l'expression de PD-L1, dont l'interaction avec PD-1 est heureusement court-circuitée par les anticorps bloquant²³³. De même, il a été montré que des associations de chimiothérapies utilisées en routine, comme le FOLFOX (composé de 5-FU et d'oxaliplatine) sont capables de diminuer l'infiltrat en Treg et en MDSC de patients atteints de cancer gastrique et pourraient s'avérer intéressantes en combinaison avec des anticorps bloquants²³⁴. Des effets similaires ont été observés dans des biopsies de patients atteints de cancer du pancréas, où une autre chimiothérapie, la gemcitabine (seule²³⁵ ou en combinaison avec des sels de platines²³⁶) diminue l'infiltrat des tumeurs par les Treg, en inhibant la voie STAT3/TGF- β .

Ainsi, moduler les conditions de traitement par chimiothérapie et chimio-immunothérapie semble pertinent afin d'induire un microenvironnement favorable à la réponse et la synergie des thérapies.

Les différentes approches de l'immunothérapie sont résumées en figure 6.

Stratégies d'immunothérapies

Les grandes cibles

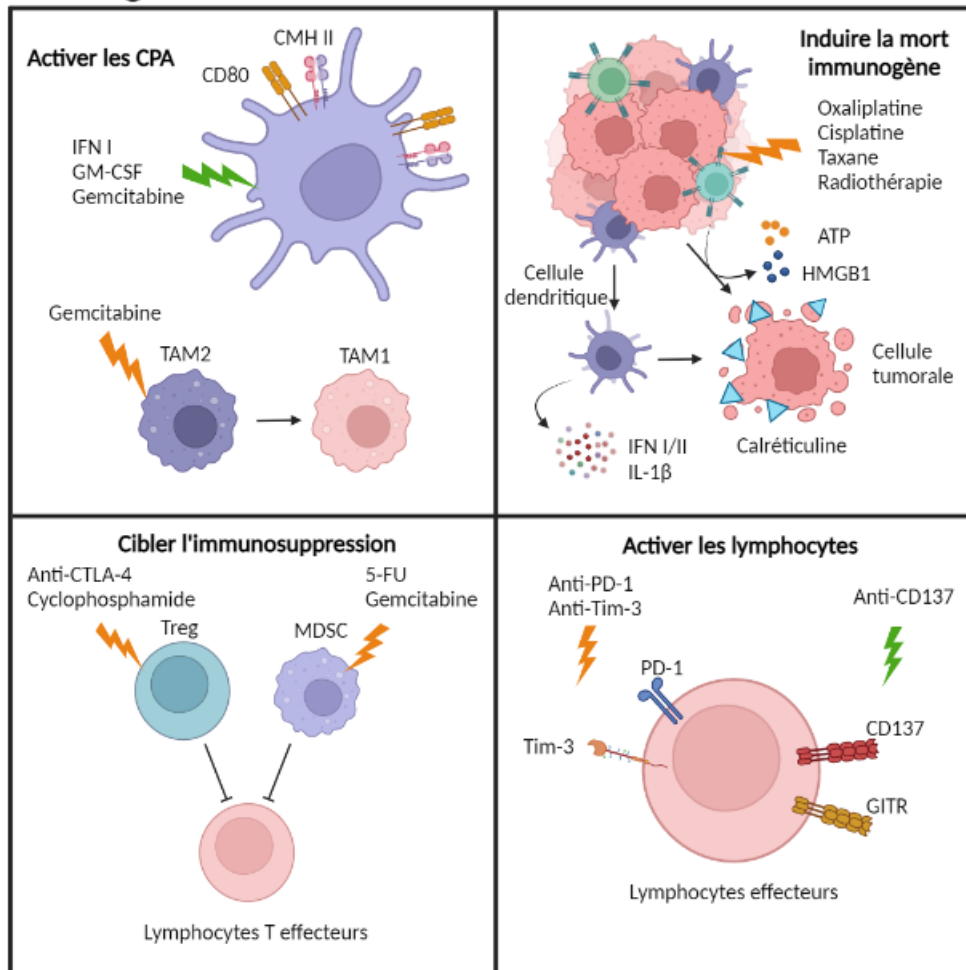


Figure 6 : Stratégies en immunothérapie : les grandes cibles. Les 4 grands buts de l'immunothérapie actuellement sont : d'activer les fonctions des cellules présentatrices d'antigènes, d'induire de la mort immunogène, d'éliminer les cellules immunosuppressives et enfin d'activer des lymphocytes T effecteurs. Les thérapies ayant un effet inhibiteur sont représentées par des éclairs jaunes, les thérapies activatrices par un éclair vert. Inspiré de Ghiringhelli, 2018.

4.3. Thérapies cellulaires : principe et limites

Les thérapies cellulaires actuellement en développement sont la génération de lymphocytes T spécifiques transformés génétiquement. Ils sont extraits du sang des patients, puis un lymphocyte est sélectionné avec un TCR pour son affinité des néoantigènes tumoraux exprimés par la tumeur du patient, afin d'être spécifique. Ensuite, le gène codant le récepteur chimérique y est inséré, les cellules sont purifiées, amplifiées et enfin réinjectées au patient. Ces modifications ont pour but d'associer les signaux d'activation et de co-activation en aval du récepteur T, afin que celui-ci puisse disposer de tous les outils pour s'activer en un seul signal, beaucoup plus rapidement et puissamment comparé à une activation classique. Le but consiste à fusionner CD3 avec les domaines intra-cellulaires des signaux de costimulation comme CD28 ou OX40²³⁷. L'efficacité des CarT reposant sur cette stratégie a rapidement été

montrée *in vitro* et *in vivo* chez la souris²³⁸, mais a eu plusieurs difficultés à s'exporter chez l'Homme, notamment dans les cancers solides. Le groupe de Kochenderfer aux États-Unis a montré en 2006 l'inefficacité des CarT dans un essai clinique de phase I dans le cancer ovarien, car incapables d'y migrer²³⁹. Par la suite, conjointement avec le groupe d'Isabelle Rivière²⁴⁰, ils ont évalué l'efficacité de la production de CarT effecteurs ciblant CD19 (un antigène fortement exprimé dans les lymphomes B) chez la souris²⁴¹, avant de l'exporter avec succès en essais cliniques^{242,243}. En 2015, sur 15 patients atteints de lymphome B diffus à grande cellules (particulièrement agressif) surexprimant CD19 et réfractaires à la chimiothérapie, 12 ont vu leur maladie régresser, dont 8 sont en rémission totale²⁴³.

Bien que très efficaces dans les tumeurs liquides, les CarT possèdent plusieurs défauts limitant leur utilisation. Il est considéré qu'ils en possèdent 4 fondamentaux²⁴⁴. Bien que leur spécificité antigénique puisse conduire à la mort des cellules cibles, ils subissent également le phénomène d'immunoédition, ce qui conduit les tumeurs à perdre cet antigène et redonner une population de cellules tumorales insensibles aux CarT. Ensuite, les CarT peuvent déclencher des réactions trop fortes ou contre les mauvaises cibles, induisant des maladies auto-immunes ou des inflammations aiguës graves, lorsqu'elles attaquent le cerveau ou le cœur²⁴⁵. Ainsi, dans le lymphome, les CarT anti-CD19 peuvent conduire à une lymphopénie de cellules B, conduisant à l'apparition de maladies opportunistes. Ils peuvent également être à l'origine d'une forte neurotoxicité dont l'origine est mal comprise, mais qui semble dépendre du taux de cytokines circulant dans le sang. En effet, une forte concentration induit une plus grande perméabilité de la barrière hémato-encéphalique ainsi qu'une migration des CarT dans le système nerveux²⁴⁶. Les CarT sont également très limités dans leurs capacités migratoires, rendant l'infiltration dans les tumeurs solides difficiles. Une des stratégies pour contourner ce problème consiste à essayer de varier les sites d'injections, voire de les injecter directement en intra-tumorale. Ces stratégies sont cependant limitées à des tumeurs non- ou peu métastatiques, rendant leurs intérêts limités par rapport à de la chirurgie ou de la radiothérapie²⁴⁷. Ainsi, des stratégies de combinaisons thérapeutiques avec les CarT pour contrer leurs limites sont à l'étude. Il a été montré par exemple qu'en association avec de la chimiothérapie immunogène, les CarT exprimant le récepteur aux chimiokines CXCR3 sont capables de transiter plus efficacement jusqu'aux tumeurs et de synergiser avec des anti-PD-1²⁴⁸, contrecarrant par la même occasion le dernier point faible des CarT : l'immunosuppression du microenvironnement tumoral, à laquelle ils sont particulièrement sensibles. De même, l'ajout des récepteurs CXCR2 ou CCR4 sur les CarT permet d'améliorer leur recrutement dans des contextes particuliers de cancers liquides et de mélanomes^{249,249}.

Les CarT représentent un espoir considérable dans le traitement des maladies diffuses (leucémies, lymphomes) et avancées, contre lesquelles les options de traitement sont limitées, voire nulles. Du fait de leur spécificité et de leur migration par voie sanguine, ils rendent les métastases à portée de traitement et donne l'espoir du développement de thérapies curatives et non plus seulement palliative. Malheureusement, il existe encore trop d'inconnus pour généraliser leur efficacité à l'ensemble des cancers, sans risques d'effets secondaires lourds.

5. NLRP3

5.1. Structure de NLRP3

NLRP3 est une protéine qui appartient à la famille des récepteurs intracytoplasmiques de type NOD (NLR). Les NLR sont des senseurs cytosoliques utilisés par l'immunité innée afin de détecter des dommages cellulaires, ainsi que les infections microbiennes. Leurs rôles physiologiques sont de lutter contre les infections en activant le système immunitaire et en induisant la mort cellulaire par le clivage de la Gasdermine-D, la maturation des caspases et le relargage de cytokines inflammatoires. NLRP3 possède trois domaines protéiques : un domaine n-terminal pyrine (pyrin domain, PYD) propre à la famille des NLRP et qui est le domaine effecteur central pour la mise en place du complexe de l'inflammasome. Ensuite, elle possède un domaine similaire d'oligomérisation de liaison aux nucléotides (NACHT), composé lui-même d'un domaine NBD (nucleotide binding domain) possédant un domaine d'activité ATPasique permettant l'oligomérisation de NLRP3 par remodelage de ses sous-unités à la suite de la fixation d'ATP. Enfin, elle possède un domaine C-terminal de répétition riche en leucine (LRR, leucin-rich repeat), précédée par un domaine de transition possédant une boucle acide propre à NLRP3 et nécessaire au maintien de sa structure ainsi qu'à son activation (figure 7a et 7b)²⁵⁰.

En 2022, une étude exhaustive sur la structure de NLRP3 parue dans Nature montre par cryomicroscopie électronique que NLRP3 est sous forme de décimères liés à de l'ADP sous sa forme inactive, dont les domaines LRR sont entrelacés (figure 6c)²⁵⁰. Dans leurs travaux sur la structure de NLRP3, les auteurs montrent ensuite que le CRID3 (ou MCC950), un inhibiteur de l'inflammasome utilisé couramment *in vitro* et *in vivo*, est capable de stabiliser NLRP3 dans cette forme inactive en liant ensemble plusieurs sous-unités du domaine NACHT avec la boucle acide du domaine de transition précédant le LRR, empêchant la fixation d'ATP sur le site NBD²⁵⁰. Après activation, NLRP3 s'associe au domaine PYD d'une autre protéine, appelée ASC (apoptosis associated speck-like protein containing a card domain), qui a pour fonction d'être un adaptateur entre NLRP3 et les caspases. En effet, elle permet par son domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain-like) de recruter la caspase 1 ou la caspase 8 et de former la structure en forme de disque, telle que décrite grâce à des techniques de cryomicroscopie par Xiao *et al.*, 2022 et caractéristique de l'inflammasome NLRP3 (figure 7c). Cette structure, biologiquement fonctionnelle, permet d'activer la pro-IL-1 β en IL-1 β , possédant une activité inflammatoire. Le rôle de NLRP3 dans la sécrétion de l'IL-1 β a été découvert par Jürg Tschopp et son équipe, qui ont décrit dans les années 2000 comment la caspase-1 pouvait être activée par une plate-forme moléculaire qu'ils baptiseront plus tard « l'inflammasome ».

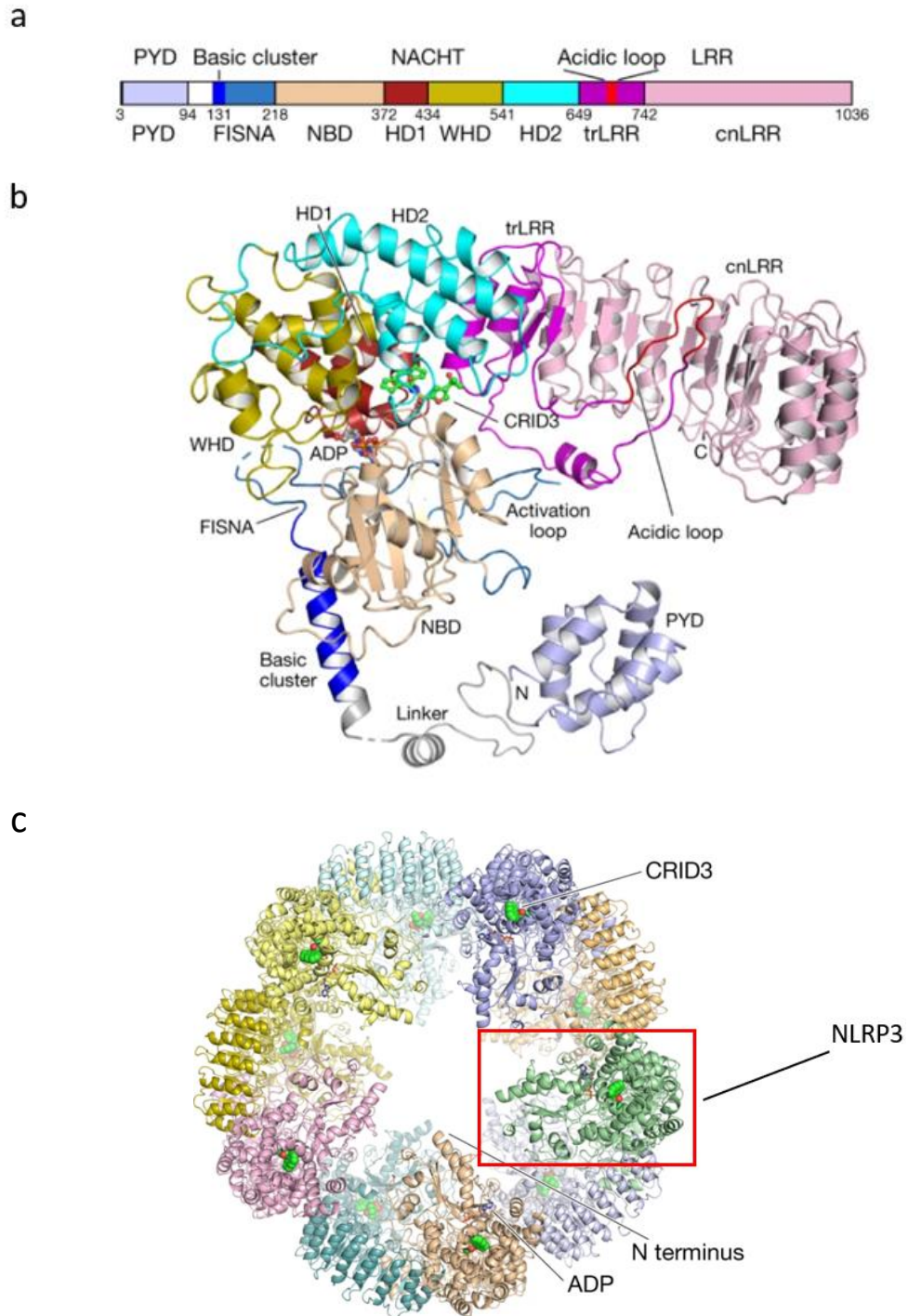


Figure 7 : Structure de NLRP3. Structure des domaines protéiques de NLRP3 (a). Conformation spatiale de NLRP3 suivant les domaines (même code couleur) que présentés en (a), le CRID3 quant à lui se fixe au creux du domaine NACHT, formant un lien avec la boucle acide du domaine pré-LRR (b). Structure quaternaire de NLRP3 organisée en décimère, dont chaque protéine NLRP3 est liée par son domaine LRR à un autre, représentée d'une couleur différente (l'interaction de CRID3 avec la boucle acide est représentée en vert) (c). Adapté de Hochheiser *et al.* (2022).

5.2. De la protéine à l'inflammasome NLRP3

5.2.1. Premier signal : l'amorçage

5.2.1.1. Signaux transcriptionnels

Pour que l'inflammasome se forme, il y a besoin de deux signaux. Le premier est le signal d'amorçage, dont la fonction est d'induire les précurseurs de la réponse inflammatoire : NLRP3, les procaspases et les pro-IL-1 β et 18. NLRP3 agissant comme un senseur des signaux de dangers, les premiers qui ont été décrits sont des signaux infectieux apparentés aux bactéries. Un des signaux typiques d'induction de NLRP3, est la reconnaissance d'éléments bactériens ou viraux par les récepteurs de type Toll (TLR). Ces récepteurs ont été découverts dans la réponse antiparasitaire dirigée contre les champignons, chez les drosophiles²⁵¹. Le TLR4 est par exemple capable de reconnaître les lipopolysaccharides (LPS) « libres » ou portés à la membrane des bactéries à Gram négatif. La voie ducteur de transcription NF- κ B est ensuite induite après activation des TLR et transduit le signal de « danger ». En reconnaissant le LPS, le TLR4 permet par exemple de détecter une infection bactérienne dont l'hôte doit se protéger. Il a été montré grâce à des agonistes des TLR dans des modèles de macrophages murins knock-out pour les TLR, que les TLR 2, 3, 4, 7, 9 et la voie du TNF- α sont capables d'induire l'expression de *Nlrp3*. Pour aller plus loin, il a été montré que l'amorçage provoqué par les TLR, le récepteur à l'IL-1 β ou par le TNFR1 est médié par les protéines MyD88, TRAF, et TRIF pour le TLR3, immédiatement en aval de ces récepteurs. Cela conduit à l'activation de IKK, qui, par phosphorylation de I κ B, permet l'activation de NF- κ B et la transcription de *Nlrp3* et *Il1b*^{252,253}. Bien que NF- κ B soit associé à la survie des cellules, sa stimulation chronique par les voies du TNF- α , de FasL ou de TRAIL est capable d'induire la transcription de *Nlrp3*^{254,255}, conduisant à la mort des cellules, si l'inflammation n'est pas résolue. Outre NF- κ B, c-Myb est un facteur de transcription impliqué dans le cycle cellulaire, la prolifération, la sénescence et fait partie des signaux participant à la survie des cellules. Cependant, il est également capable d'avoir un impact sur la transcription de *Nlrp3* en induisant NF- κ B mais aussi par fixation directe sur le promoteur de *Nlrp3*^{256,257}. Ahr, dont le rôle dans l'immunosuppression est de plus en plus décrit²⁵⁸, est, quant à lui, un médiateur de la signalisation intracellulaire de la tolérance intestinale, capable de reconnaître divers composants chimiques, comme les polluants ou les indoles, synthétisés par le microbiote. Ses interactions avec *Nlrp3* sont encore mal connues, mais il semblerait qu'Ahr soit un inhibiteur de NF- κ B et donc un répresseur de la transcription de *Nlrp3*.

5.2.1.2. Signaux non transcriptionnels

Les signaux induits par les TLR, TNFR ou IL1- β R ne sont pas que transcriptionnels et l'activation de la voie IRAK1 ou FADD peut engendrer la synthèse de ROS mitochondriaux et l'activation rapide de NLRP3, dont l'expression basale suffit à déclencher la mise en place de l'inflammasome^{259,260}. L'activation de la caspase-8 par les récepteurs de mort peut aussi shunter l'étape transcriptionnelle pour activer directement NLRP3, à travers la sécrétion de ROS mitochondriaux, indépendamment de son rôle dans l'apoptose²⁶¹. Parmi les signaux non

transcriptionnels, il existe également les signaux post-traductionnels. Song *et al.*, 2017, ont identifié en coexprimant les protéines de l'inflammasome dans des cellules HEK293T, 6 sites de phosphorylation de NLRP3. Parmi ces sites, seule la déplétion (par substitution de la sérine par une alanine non-phosphorylable) du site S198 (S194 chez la souris), présente dans le domaine NACHT, a conduit à l'inactivation de NLRP3, démontrant le rôle majeur de cette phosphorylation dans son fonctionnement. Les auteurs ont ensuite démontré que cette phosphorylation avait lieu rapidement après divers stimuli impliquant les TLR, qu'elle n'est pas exclusive au TLR4 et qu'elle est médiée par la kinase JNK1, en réponse à la voie IRAK1/4 activée par la fixation de LPS sur le TLR4²⁶². Par la suite, Niu *et al.*, 2021, ont montré par spectrométrie de masse et grâce à divers inhibiteurs utilisés dans des cellules 293T exprimant une protéine NLRP3 taguée, que NLRP3 est phosphorylé sur les résidus sérines S735, S806 et S1035 et ubiquitinylé sur les résidus K878, K927 et K973 du domaine LRR²⁶³. Parmi ces modifications, seule la délétion de la S806 a conduit à un défaut de sécrétion d'IL-1 β , démontrant son rôle déterminant dans l'activation de NLRP3. Par la suite, grâce à un modèle de BMDM (macrophages dérivés de moelle osseuse) immortalisé, ils ont montré que l'absence de cette phosphorylation empêche le recrutement de la deubiquitinase BRCC3, connue pour activer NLRP3 en deubiquitinant le domaine LRR de NLRP3²⁶⁴. En effet, NLRP3 peut aussi être la cible d'ubiquitines ligases sur son résidu lysine 48 (K48). Par exemple, TRIM 31 (Tripartite motif containing 31) est capable d'induire la dégradation de NLRP3 par le protéasome et d'empêcher son activation. De fait, la déficience en TRIM31 induit une surexpression de l'IL-1 β dans les macrophages stimulés par du LPS²⁶⁵. De la même manière, la présence d'ubiquitine sur NLRP3 permet également d'orienter sa dégradation par l'autophagie, via l'ubiquitinylation de la lysine 63 (K63) par MARCH7²⁶⁶.

5.2.2. Second signal : l'activation

5.2.2.1. Signaux ioniques

Le premier signal ne suffit pas à déclencher la mise en place de l'inflammasome mais permet la synthèse de ses précurseurs et l'amorçage de NLRP3 dans une forme activable. Le second signal, dit d'activation, permet de confirmer la nécessité de déclencher une réponse inflammatoire ou la mort cellulaire. Les principaux signaux d'activation sont la détection d'ATP extracellulaire, les flux d'ions, les particules toxiques (comme les cristaux d'acide urique, la silice ou l'aluminium) ou encore les stressés métaboliques (production de ROS). Le relargage d'ATP est un des emblèmes de la mort immunogène (ICD) des cellules²⁶⁷. Les récepteurs capables de détecter l'ATP extracellulaire (eATP) sont les récepteurs P2XR. Perregaux et Gabel ont démontré en 1994 que l'eATP était capable de provoquer la sécrétion d'IL-1 β , mais que ce phénomène est dépendant du potassium²⁶⁸. Ils n'ont cependant pas montré comment ce mécanisme fonctionnait, ni quel était spécifiquement le rôle du potassium. Peu après, Ferrari *et al.*, 1996, ont réussi à montrer que le récepteur responsable de la détection d'eATP et de l'efflux de potassium est P2X7R²⁶⁹. Depuis, P2X7R est connu comme un des récepteurs majeurs de la détection de l'eATP. En effet, il peut se lier à l'ATP et permettre l'efflux de K⁺, du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire²⁷⁰. Certaines toxines bactériennes, comme la nigéricine, peuvent produire le même effet d'efflux et activer NLRP3²⁷¹. P2X7R fonctionne conjointement avec le canal TWIK2 (Two-pore domain potassium channel). TWIK2

est exprimé à la surface des cellules mais aussi des lysosomes, permettant la diminution du K⁺ cytoplasmique en le séquestrant à l'intérieur de ces organites²⁷². Parallèlement à l'efflux de potassium, celui de chlorure à travers les canaux CLIC (Chloride Intracellular Channels) joue également un rôle important dans l'activation de NLRP3, en régulant l'oligomérisation de la protéine ASC. En plus de ces deux ions, les changements de concentration de calcium semblent aussi être importants dans l'activation de NLRP3, néanmoins, les mécanismes exacts semblent encore assez flous. En outre, le calcium semble être un activateur de NLRP3 possible, mais non-essentiel, grâce aux récepteurs du calcium CASR (Calcium Sensing Receptors) couplés à une protéine G 6A (GPRC6A)^{273,274}. Jäger *et al.*, a montré en 2020 dans un contexte de polyarthrite rhumatoïde, que des monocytes humains pathogéniques peuvent surexprimer les CASR et que cette signalisation calcique est associée à une progression de la maladie dépendamment de l'IL-1 β , laissant supposer que ces canaux ont bel et bien un rôle dans l'activation de NLRP3²⁷⁵. Il existe d'autres types de récepteurs ionotropes qui peuvent activer NLRP3 en se comportant comme des senseurs de l'acidité extracellulaire. C'est le cas par exemple des canaux ASIC (Acid-Sensing Ion Channels). En 2013, Rajamaki *et al.*, ont montré *in vitro* que le pH extracellulaire peut activer NLRP3 et la sécrétion de cytokines associées dans un modèle de monocytes humains THP-1, mais que cette sécrétion est annulée lorsque NLRP3 est inhibé²⁷⁶. Il a été montré plus récemment dans un contexte de troubles articulaires intervertébraux, que l'expression de NLRP3 dans les cellules du noyau pulpeux est corrélée à l'acidification du milieu extracellulaire et à l'activation des canaux acides, conférant à l'acidité extracellulaire un rôle de signal de danger pouvant induire une réponse inflammatoire.

5.2.2.1. Ruptures lysosomales

De manière intéressante, les acides gras peuvent aussi agir en tant qu'activateurs de NLRP3. Les acides gras saturés agiraient comme des activateurs de NLRP3 en cristallisant dans les lysosomes, tandis que les acides gras polyinsaturés, comme des inhibiteurs^{277,278}. De fait, NLRP3 et l'IL-1 β semblent jouer un rôle dans l'apparition des plaques d'athérosclérose provenant des macrophages spumeux²⁷⁹. NLRP3 peut être activé par des particules métalliques, comme les adjuvants présents dans les vaccins (sels d'aluminium) dont le rôle, bien que controversé dans l'activation de NLRP3, semble dépendre encore une fois de récepteurs GPRC6A²⁸⁰. Il peut aussi être activé par des polluants environnementaux, comme l'amiante ou la silice, ou encore des cristaux. L'amiante et les oxydes de silice sont des fibres minérales capables d'activer NLRP3 et de provoquer des réactions inflammatoires des voies respiratoires. Ces réactions conduisent à des maladies fibrosantes appelées silicose ou asbestose, pouvant évoluer en cancer des poumons²⁸¹. Ces fibres provoquent la rupture des lysosomes par « éclatement », libérant les enzymes à l'intérieur, notamment les cathepsines, qui sont capables d'activer NLRP3²⁸². Le même type de réaction se produit avec les cristaux monosodiques d'urate présents dans la goutte, une forme d'arthropathie microcristalline. Bien que ces signaux soient communément admis comme activateurs de NLRP3, le mécanisme exact de leur signalisation cellulaire est toujours à l'étude. Il a également été proposé que les récepteurs de type NLR pourraient interagir directement avec les particules cristallines, minérales ou métalliques, sans avoir besoin des lysosomes comme intermédiaires²⁸³.

5.2.2.1. Mitochondries et ROS

Les espèces réactives de l'oxygène sont une très grande famille de signaux intra-et extracellulaires impliqués dans l'homéostasie des cellules, dont beaucoup de stimuli peuvent déclencher leur production. Typiquement, le vieillissement, l'infection par des adénovirus, les mycoses, l'asbestose ou les rayons ultraviolets induisent la production de ROS par la mitochondrie, les lysosomes ou des enzymes comme la NADPH oxydase (NOX)²⁸⁴. Groß *et al.*, 2016, ont montré que de petites molécules ciblant les mitochondries peuvent activer l'inflammasome NLRP3 et la maturation de la pro-IL-1 β grâce à la production de ROS, mais que les mitochondries, bien qu'utiles, ne sont pas indispensables²⁸⁵. Parmi les médiateurs cellulaires des ROS, l'un des messagers les plus étudiés est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Il peut, en lui-même, activer NLRP3²⁸⁶ bien que paradoxalement, la production d'H₂O₂ par certaines bactéries intracellulaires induise l'inactivation oxydative de NLRP3, montrant que celui-ci peut interagir directement avec l'H₂O₂²⁸⁷. En parallèle, la thioredoxin-interacting protein (TXNIP) a été de plus en plus étudiée ces dernières années pour son rôle dans le métabolisme oxydatif. TXNIP peut aussi directement interagir avec NLRP3 et initier la structure 3D de l'inflammasome²⁸⁸. De plus, le Vérapamil, un inhibiteur de TXNIP, peut bloquer cette interaction et réprimer l'activation de NLRP3 dans l'inflammation liée au vieillissement chez la souris²⁸⁹. Ensemble, les ruptures lysosomales et les stressés mitochondriaux peuvent conduire à la production de ROS en grande quantité, qui, en activant NLRP3, conduisent à une inflammation aigüe, puis à l'apoptose des cellules²⁹⁰. Outre leur rôle dans la production de ROS, les mitochondries jouent aussi un rôle dans la mise en place de NLRP3, en faisant office de détecteurs d'infections virales grâce aux protéines mitochondriales détectrices antivirales (MAVS). Cette détection fait partie des signaux d'initiation de l'oligomérisation de NLRP3^{291,292}

5.2.1. Formation de l'inflammasome NLRP3 et conséquences

Pour être fonctionnelles, les protéines composant l'inflammasome ont besoin d'interagir ensemble. En induisant l'expression des composants de l'inflammasome (NLRP3, ASC, procaspase-1 et pro-IL-1 β) dans des cellules 293T qui ne l'expriment pas naturellement, Jürg Tschopp et son équipe ont montré en 2004 que les surexpressions de NLRP3 ou ASC seules n'étaient pas suffisantes à induire l'activation de la caspase-1 et la procession d'IL-1 β . Par la suite, ils ont montré par immunoprécipitation que NLRP3 et ASC interagissaient ensemble et que seul l'ajout de plasmides codant pour ASC dans des 293T exprimant NLRP3, la procaspase-1 et la pro-IL-1 β , permettait de les activer²⁹³. Pour interagir, le réarrangement du système microtubulaire semble nécessaire dans la rencontre entre NLRP3 et ASC. Les activateurs de NLRP3 entraînent une diminution du niveau intracellulaire de NAD⁺ et peuvent inhiber l' α -tubuline désacétylase sirtuine 2 (SIRT2). Cette inhibition conduit à une augmentation du niveau d' α -tubuline acétylée, permettant le transport (dépendant des complexes de dynéines) de ASC jusqu'à NLRP3, au niveau des mitochondries²⁹⁴. De plus, la protéine « microtubule-affinity regulating kinase 4 » (MARK4), semble être cruciale dans l'adressage de NLRP3 aux centrosomes, organisateurs des microtubules, pour y rencontrer

une protéine impliquée dans la mitose et indispensable afin de former la structure en forme de disque de l'inflammasome : NEK7 (NIMA Related Kinase 7)²⁹⁵. Initialement décrite comme un acteur de la mitose, dont l'absence provoque des malformations sévères ou des morts prématurées, NEK7 et NLRP3 ne peuvent interagir qu'en interphase, lorsque NEK7 n'est plus engagée dans la mitose. Il a été montré que NEK7 peut interagir avec NLRP3 au niveau de son domaine LRR après divers stimuli, comme l'ATP, les sels d'aluminium ou la détection de ROS, démontrant l'importance de NEK7 dans l'activation de NLRP3²⁶³. De manière intéressante, dans les maladies auto-immunes, bien que la suractivation de NLRP3 semble indépendante du potassium, la présence de NEK7 est quant à elle nécessaire. En sachant que les mutations pathogéniques des maladies auto-immunes associées à NLRP3 sont retrouvées dans les domaines NACHT et LRR, il est possible que l'interaction forcée entre ces deux protéines soit un driver de la maladie^{296,297}. À la suite de l'activation de NLRP3 et de la mise en place de l'inflammasome, la caspase-1 mature est finalement capable d'activer la sécrétion d'IL-1 β , d'une part en la maturant et d'autre part en clivant la gasdermine-D (GSDMD) en N-gasdermine-D (N-GSDMD). L'activation de la GSDMD a pour conséquences la formation de pores dans la cellule conduisant à la pyroptose, une mort immunogène qui participe aux relargages de molécules pro-inflammatoires (sécrétion d'IL-1 β et relargage d'ATP), amplifiant les signaux de dangers capables d'activer le système immunitaire *in situ* en réponse à un danger²⁹⁸. Lorsque que, par défense, la voie d'activation de la gasdermine-D par la voie NF- κ B est bloquée intra-cellulairement par des bactéries (notamment du genre *Yersinia*, responsable de tuberculoses, d'infections gastrointestinales, de la peste et capables d'inactiver IKK par acétylation²⁹⁹) et empêche la mort cellulaire, la voie RIP1 associée au TNFR1 peut activer la caspase-8, capable d'activer directement la caspase-1 ou la gasdermine-D en tant que voie d'apoptose et d'inflammation de secours³⁰⁰.

Ainsi, il existe de nombreux activateurs de l'inflammasome à NLRP3, permettant de s'entre-activer en cas de besoins pour s'adapter aux infections bactériennes et induire l'inflammation et l'apoptose des cellules infectées.

Les signaux activateurs de NLRP3 sont décrits en figure 8.

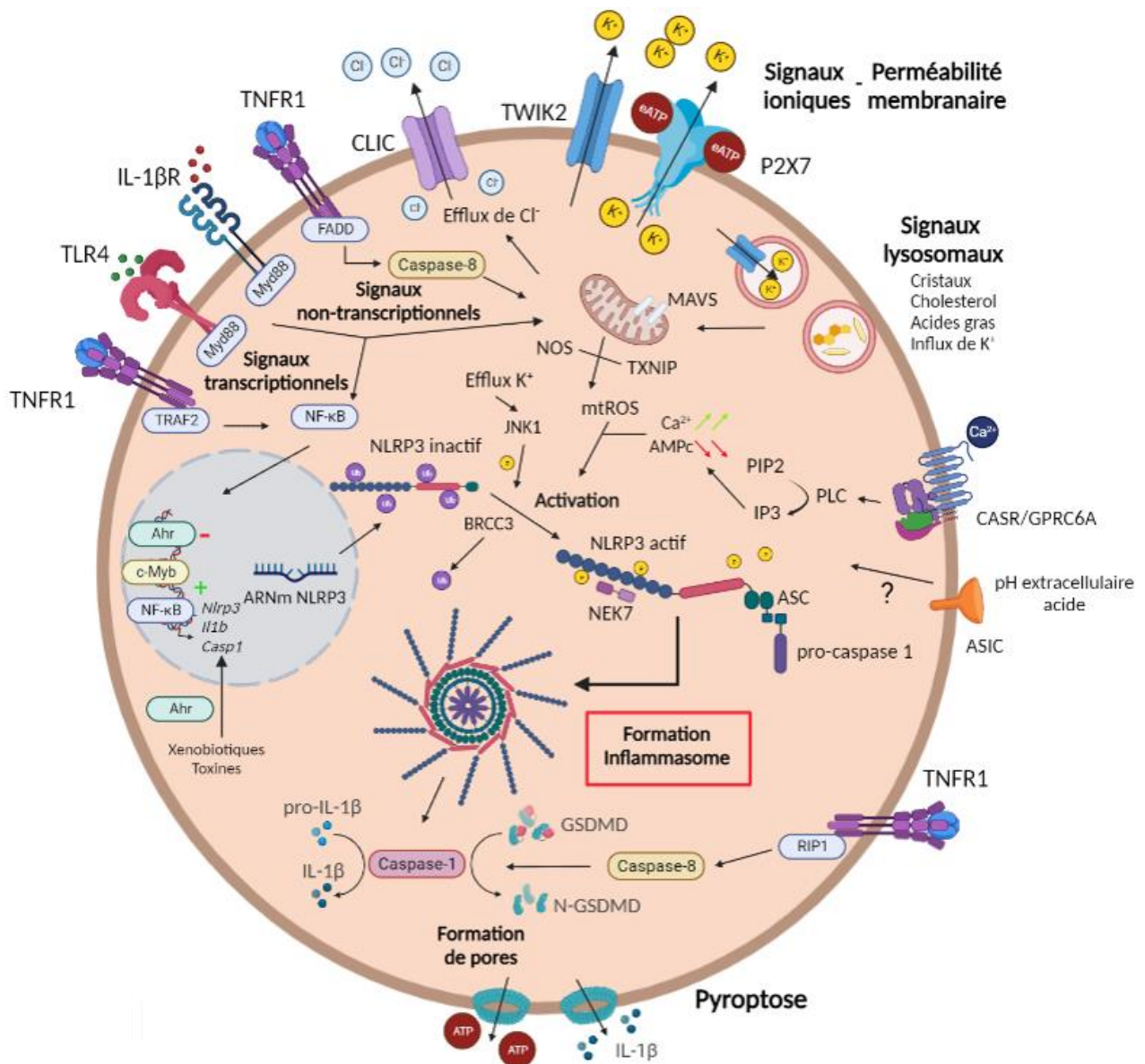


Figure 8 : Amorçage et activation de NLRP3 : signaux typiques induisant l'expression et la mise en place de l'inflammasome NLRP3 dans la réponse inflammatoire. Beaucoup de cellules sont capables de répondre aux agressions externes, après la détection de signaux de danger. Dans les cellules myéloïdes, les infections sont détectées à travers des récepteurs appelés TLR, qui induisent l'expression de NF-κB et de ROS mitochondriaux, conduisant à l'expression et l'activation de NLRP3. D'autres signaux, de mort ou d'inflammation (détection d'IL-1β par l'IL-1βR ou de TNF-α par le TNFR1) peuvent aussi amorcer et activer NLRP3. Par la suite, NLRP3 a besoin d'un second signal et d'activation, à travers la perturbation d'équilibres ioniques (efflux de K⁺ ou Cl⁻, par les pompes P2X7, TWIK2 et CLIC, de l'équilibre en Ca²⁺ par les CASR et du pH extracellulaire par les ASIC), les ruptures lysosomales et la sécrétion de ROS mitochondriaux (mtROS). Ces signaux conduisent à l'activation de NLRP3 par phosphorylation et déubiquitinylation, conduisant à l'interaction de NEK7 avec son domaine LRR, avec ASC par leur domaine PYD et enfin entre ASC et la pro-caspase-1 *via* leurs domaine CARD. Ces interactions conduisent à l'activation de la caspase-1 et la maturation de la pro-IL-1β en IL-1β et de la gasdermine-D en N-gasdermine-D. L'activation de la gasdermine-D permet ensuite la formation de pores dans la cellule conduisant à la pyroptose, une mort immunogène amplifiant la réponse immunitaire, par la sécrétion d'IL-1β et d'ATP. Par voie de secours, la caspase-8 est capable d'activer NLRP3 mais aussi la GSDMD et la caspase-1 directement grâce à la voie du TNFR1, lorsque la voie NF-κB est inhibée par les pathogènes, permettant aux cellules de s'adapter dans la réponse aux pathogènes qui les infectent. Adapté d'Accogli *et al.*, 2023.

5.3. Fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3

Bien que le rôle de NLRP3 dans la formation de l'inflammasome soit très décrit, il existe peu d'études concernant ses fonctions indépendantes de cet inflammasome. NLRP3 semble pourtant posséder des fonctions cytoplasmiques alternatives, mais aussi un rôle dans la régulation des gènes ou du métabolisme mitochondrial, indépendamment de ses fonctions dans l'inflammasome.

5.3.1. NLRP3, TGF- β et fibrose

Shigeoka *et al.*, ont été dans les premiers en 2010 à décrire un rôle de NLRP3 indépendant de l'inflammasome. Cette étude ciblait l'implication de NLRP3 dans les lésions rénales d'ischémie-reperfusion (IRI). Dans ce but, l'équipe de Shigeoka a utilisé plusieurs souches de souris transgéniques déficientes pour les composants de l'inflammasome. Bien que NLRP3 et ASC soient exprimés dans l'épithélium tubulaire rénal, seule l'absence de NLRP3 protégeait des lésions. De plus, il n'y avait aucun effet protecteur de la déficience de la caspase 1, du récepteur à l'IL-1 β ou l'IL-18, chez la souris. De plus, les souris xéno greffées par de la moelle osseuse de souris *Nlrp3*^{-/-} n'ont montré aucune protection face à l'IRI, soulignant que la pathogenèse de la maladie n'est pas due à une fonction inflammatoire liée à l'immunité, mais à une fonction indépendante de l'inflammasome de NLRP3 dans le tissu rénal³⁰¹. Malgré la mise en lumière d'un rôle non conventionnel de NLRP3, l'étude n'évoque aucune piste concernant le mécanisme lié à NLRP3 dans l'épithélium rénal. Cependant, ces premières données ont été suivies de celles de Wang *et al.*, en 2013, qui ont montré que NLRP3 participe à la signalisation du TGF- β . En effet, ils ont démontré que traiter des cellules épithéliales tubulaires proximales humaines avec du TGF- β augmente l'expression de NLRP3, qui disparaît en présence d'inhibiteur de SMAD3. Par la suite, ils ont montré que lorsque ces cellules sont *Nlrp3*^{-/-} elles sont moins sensibles à la transition épithéliomésenchymateuse (EMT) dérivée de la voie des R-SMAD dans l'épithélium rénal^{302,303}. Ils ont montré que les cellules épithéliales déficientes pour NLRP3 perdent en grande partie l'expression des métalloprotéases matricielles 2 et 9 (MMP2 et 9) et de l' α -SMA, favorisant l'EMT. Les auteurs ont ensuite transfecté des cellules 293T avec des plasmides codant NLRP3 et ASC. De manière attendue, l'expression de NLRP3 a conduit à l'activation de la voie des R-SMAD dans les 293T. De manière plus surprenante, la transduction d'ASC a elle aussi permis l'activation de cette voie, suggérant que NLRP3, mais aussi ASC, pourraient impacter la voie du TGF- β indépendamment de l'inflammasome. Ce phénomène a aussi été décrit dans des lignées de cellules de cancer du côlon HCT116 et HT29, où NLRP3 induit l'expression de marqueurs de l'EMT³⁰⁴.

NLRP3 est capable de promouvoir la fibrose dans d'autres sous-types cellulaires, comme les cellules endothéliales sinusoidales du foie ou les myofibroblastes de la peau. En revanche, NLRP3 a été décrit comme jouant un rôle non conventionnel dans les myofibroblastes cardiaques. En rapport avec les précédents résultats obtenus dans le rein, l'absence de NLRP3 dans ces cellules modifie la signalisation de la voie R-Smad sous l'impulsion du TGF- β . Cette

dysfonction diminue la différenciation des fibroblastes et protège les souris des fibroses cardiaques induites par l'angiotensine-II. De plus, la fixation d'ATP sur le domaine NACHT de NLRP3 semble critique dans l'activation des protéines SMAD, qui dépend de l'induction de ROS produits par la mitochondrie sous l'influence de NLRP3. En effet, il a été montré que NLRP3 peut co-localiser avec la mitochondrie dans les fibroblastes cardiaques humains et que la surexpression de NLRP3 dans les cellules 293T conduit à une augmentation de la production de mtROS. Similairement aux cellules rénales et bien que les fibroblastes cardiaques *Casp1*^{-/-} produisent une quantité similaire de mtROS par rapport à leurs contrôles, les fibroblastes *Nlrp3*^{-/-} ont, eux, un niveau de mtROS diminué^{303,305}. Etudier le rôle de NLRP3 dans les mitochondries ramène historiquement à son rôle dans les lésions rénales, puisqu'il a été montré que NLRP3 est impliqué dans les dommages mitochondriaux induits par l'hypoxie dans le tissu rénal. En fait, l'expression de NLRP3 dans les cellules tubulaires épithéliales de rein est augmentée durant l'hypoxie, ce qui conduit à sa relocalisation au niveau des mitochondries, même en l'absence de ASC ou de la caspase-1. Cette induction de NLRP3 ne s'accompagne cependant pas par une sécrétion d'IL-1 β . NLRP3 est capable d'interagir avec les mitochondries au niveau des protéines de signalisation antivirales, dont la délétion augmente la mitophagie et protège des dommages produits par les mitochondries, induits par l'hypoxie. Cette protection a été démontrée *in vivo*, par une diminution de la fibrose rénale³⁰⁶. De la même manière, cet effet s'observe aussi dans la fibrose associée aux infections pulmonaires, où les cellules *Nlrp3*^{-/-} sont protégées, contrairement à celles *ASC*^{-/-} ou *Casp1/11*^{-/-}. Dans ce contexte, NLRP3 semble diminuer le recrutement précoce des cellules neutrophiles par un mécanisme indépendant de l'inflammasome³⁰⁷. Ensemble, ces résultats soulignent que NLRP3 possède des rôles qui ne dépendent pas de l'inflammasome et de la sécrétion d'IL-1 β ou d'IL-18³⁰⁸. Il a aussi été montré dans d'autres modèles de lésions rénales (notamment induites par une forte concentration de glucose) que l'inhibition de NLRP3 par un shRNA dans un modèle de cellules humaines immortalisées de rein Hk-2, réduit la phosphorylation de SMAD3, P38 et ERK ainsi que l'EMT. Cependant, il n'est pas clairement établi si ce phénomène dépend ou non d'une fonction indépendante de l'inflammasome de NLRP3 ou de la sécrétion d'IL-1 β ou d'IL-18³⁰⁹. Par la suite, d'autres contextes dans lesquels NLRP3 est impliqué dans la voie du TGF- β ont été décrits. Par exemple, dans un modèle de souris développant spontanément des maladies auto-immunes (B6^{lpr}), l'absence de NLRP3 et de ASC augmente spontanément la gravité des néphrites associées au lupus, contrairement à l'absence d'IL-1 β ou d'IL-18. Il a été montré qu'en leur absence, les cellules dendritiques présentent une plus faible phosphorylation et une diminution de la translocation de Smad2/3 au noyau, conduisant à une diminution de la transcription des gènes cibles de la voie du TGF- β ³¹⁰.

5.3.1. NLRP3, un acteur nucléaire

Dans les cellules immunitaires, notre équipe a montré en 2015 que NLRP3 possède d'autres fonctions indépendantes de l'inflammasome. Il est capable de transloquer dans le noyau des cellules T CD4 dans un contexte cytokinique (IL-4 et anticorps bloquant l'IFN- γ) polarisant les T CD4 naïfs en T helper 2 (Th2). En effet, chez les T CD4 murins, après stimulation du TCR, la stimulation par de l'IL-2 (auto-ou paracrine) active la phosphorylation de STAT5. Une fois activé, STAT5 est ensuite capable de se fixer sur le promoteur du gène *Nlrp3* et d'induire sa transcription. Dans les conditions polarisantes, KPNA2 est l'importine responsable de la translocation de NLRP3 dans le noyau des T CD4 naïfs. Dans le noyau, NLRP3 interagit alors avec IRF4 au niveau de son domaine LRR, afin de former un complexe protéique capable d'exercer son rôle de facteur de transcription. Là, le complexe régule l'expression des gènes permettant la différenciation des T CD4 naïfs en Th2, à savoir *Il4*, *Il5*, *Il13* et *Gata3* (figure 9). En l'absence de NLRP3, les cellules T CD4 naïves ont une capacité réduite à se différencier en Th2. Dans un modèle d'asthme dépendant des Th2, il a été montré que l'absence de NLRP3 dans les T CD4 diminue l'infiltration en cellules éosinophiles, ainsi que la quantité d'IL-4 dans les poumons. De la même manière, les Th2 étant de mauvais pronostic dans de nombreux cancers, les auteurs ont montré que les poumons de souris *Nlrp3*^{-/-} présentent une infiltration en cellules tumorales de mélanome (B16F10) bien inférieure à leur contrôle³¹¹.

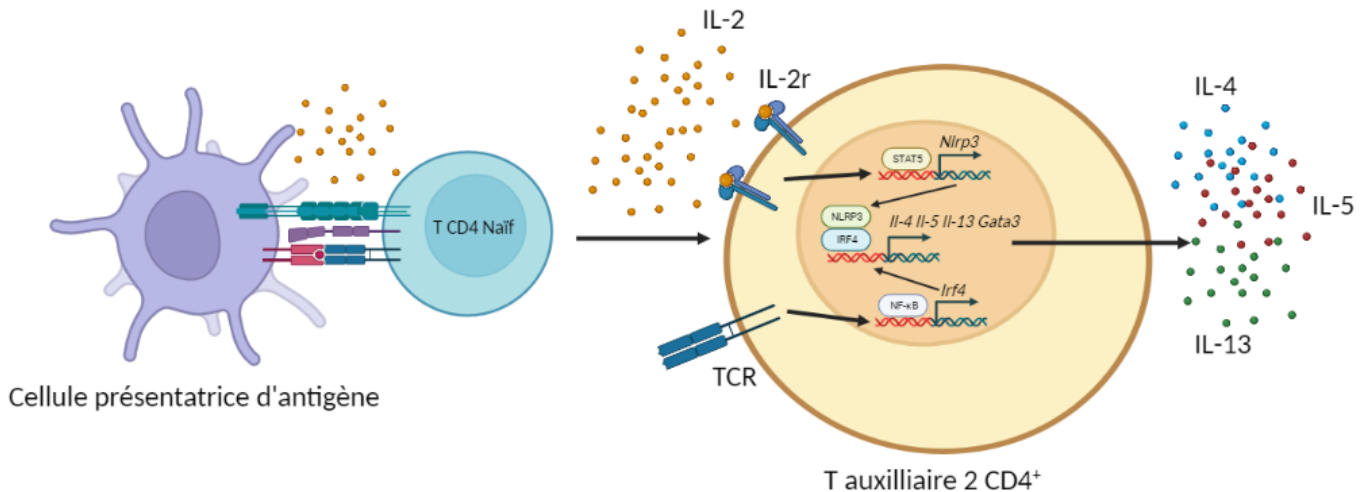


Figure 9 : Rôle de NLRP3 dans les lymphocytes Th2. Après la stimulation d'un T CD4 naïf par une cellule présentatrice d'antigène, l'IL-2 présente dans le milieu extracellulaire induit l'expression de NLRP3, tandis que le signal du TCR induit l'expression d'IRF4. NLRP3 s'associe ensuite avec IRF4 afin de former un complexe protéique jouant un rôle de facteur de transcription impliqué dans la mise en place du programme transcriptionnel des lymphocytes Th2. Ce complexe cible par exemple les gènes codant l'expression des cytokines IL-4, 5 et 13, ou encore le facteur de transcription clef dans la différenciation en Th2, Gata3.

Une autre étude a montré la translocation de NLRP3 dans le noyau des Treg dans lesquels NLRP3 interagit avec KPNA2 au niveau de son domaine LRR. Les résultats suggèrent que NLRP3 restreint les fonctions des Treg, mais n'a démontré qu'un faible gain de fonction des Treg lors de la délétion de NLRP3³¹². Une étude récente a cependant montré dans un modèle murin d'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) de souris RAG^{-/-}, que NLRP3 est responsable dans les populations de T CD4 reconstituées, d'une augmentation de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 et d'une réduction de la sécrétion d'IFN- γ dans le tissu nerveux. Dans ce contexte-là, NLRP3 jouerait donc un rôle plutôt immunosuppresseur dans les populations de T CD4³¹³. L'interaction entre NLRP3 et IRF4 est aussi présente dans les macrophages, où elle permet la différenciation des macrophages par l'IL-4, en macrophage M2³¹⁴. Récemment, ces résultats ont été confirmés et le mécanisme élucidé. L'enzyme Ubiquitin Specific Peptidase 19 (USP19) protège NLRP3 de la dégradation en clivant l'ubiquitine de NLRP3, empêchant son adressage au protéasome. Après stimulation à l'IL-4, NLRP3 se lie à IRF4, ce qui le protège à son tour de la dégradation par l'autophagie dépendante de p62 et promeut la différenciation des macrophages en M2. Cependant, l'article n'investigue pas si NLRP3 potentialise ou non le rôle de facteur de transcription d'IRF4, à l'instar des Th2³¹⁵. NLRP3 semble aussi pouvoir interagir avec IRF4 dans les cellules épithéliales humaines immortalisées, afin de se fixer sur le promoteur de l'IL33 et promouvoir sa sécrétion, à la base de lésions eczémateuses dans la dermatite atopique. L'implication de NLRP3 dans la dermatite atopique et la sécrétion d'IL-33 reste encore largement méconnue chez l'Homme. Un autre exemple du rôle de NLRP3 dans la régulation de l'expression des gènes a été montré dans l'arythmogénèse de patients atteints de fibrillations cardiaques atriales. NLRP3 est capable d'augmenter la synthèse d'ARNm codant pour des sous-unités de 4 canaux ioniques (RyR2, Kv1.5, GIRK1 et GIRK4) impliqués dans le métabolisme cardiaque et l'arythmie. Cependant, le rôle précis de NLRP3 en tant que facteur de transcription ou simple stabilisateur de l'ARNm n'est pas investigué³¹⁶. Une étude plus récente a confirmé le rôle non conventionnel de NLRP3 dans la fibrillation atriale, provoquant la hausse d'ARNm codant pour les canaux ioniques. Cependant, elle n'explique toujours pas à quel niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel NLRP3 pourrait intervenir³¹⁷. Bien que l'inflammasome à NLRP3 ait été décrit comme ayant un rôle dans les CD4 Th1 humains³¹⁸, il existe très peu de données sur l'impact de l'expression de NLRP3 dans les T CD8. Arbore *et al.*, 2016, puis 2018 ont démontré que le récepteur du complément CD46 agit en tant que signal de costimulation en synergie avec le signal TCR dans les T CD4 et CD8. Ce signal induit l'expression de NLRP3 dans les T CD4 et CD8 et l'étude montre dans les Th1 que leur activité dépend de NLRP3 et de la sécrétion autocrine d'IL-1 β induite en réponse à cette costimulation³¹⁸. Dans les T CD8 humain, l'activation de la voie CD46 augmente aussi leur activité (par la sécrétion de granzyme B ou d'IFN- γ), mais n'active pas la voie de l'inflammasome et aucune sécrétion d'IL-1 β n'a pu être détectée. De plus, les T CD8 de patients atteints de maladies auto-immunes qui présentent une suractivation de NLRP3 ont une activité similaire à ceux des patients sains et les blocages de NLRP3 par des inhibiteurs de l'inflammasome ou de l'IL-1 β n'ont aucun impact sur la sécrétion d'IFN- γ ou de granzyme B des T CD8 stimulés par des anticorps anti-CD46, montrant l'indépendance de cette activation par CD46 vis-à-vis des fonctions dépendantes de l'inflammasome de NLRP3. Les auteurs ont cependant remarqué que NLRP3 est présent dans le noyau des T CD8 humains et bien qu'ils

n'aient pas explorer cette piste, NLRP3 pourrait également exercer un rôle indépendant de l'inflammasome dans les cellules T CD8³¹⁹.

5.3.1. NLRP3 et réparation de l'ADN

La protéine ataxia telangiectasia mutated (ATM kinase) est une protéine découverte pour son rôle dans le syndrome de Louis-Bar. Elle est l'un des premiers senseurs à détecter les cassures double-brins de l'ADN. Erttmann *et al.*, sont les premiers en 2016 à établir un lien entre l'inflammasome NLRP3 et la protéine ATM. Il a été observé dans les cellules de patients et les BMDM de souris ATM^{-/-}, une diminution de l'activité de la caspase-1 et de la sécrétion d'IL-1 β . Cette diminution s'explique par un défaut de la mise en place de l'inflammasome, à cause d'une dégradation oxydative de ses composants³²⁰. Très récemment, une étude a démontré les fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3 dans la réparation de l'ADN. Bodnar-Wachtel *et al.*, ont montré que NLRP3 pouvait se lier à ATM, indépendamment de sa fonction dans l'inflammasome. En effet, NLRP3 interagit avec ATM au niveau de son domaine NACHT et LRR, mais pas PYD. NLRP3 pourrait permettre la translocation d'ATM au noyau, ou bien son oligomérisation. De manière intéressante, les auteurs montrent que les cellules cancéreuses de poumons non à petites cellules perdent l'expression de NLRP3 et sont plus résistantes aux stressés génotoxiques. Les auteurs confirment aussi les données obtenues précédemment par Bruchard *et al.*, en montrant que NLRP3 peut être nucléaire et transloquer dans le noyau, mais cette fois par l'importine IPO5 puis externalisé par l'exportine XPO2³²¹.

5.1. NLRP3 : une cible thérapeutique ?

5.1.1. NLRP3, auto-immunité et système nerveux

NLRP3 a été découvert car il était suspecté d'être impliqué dans des maladies auto-immunes d'origine génétique. En effet, il a été montré que certaines mutations de *NLRP3* chez les patients sont associées à une maladie appelée le Syndrome auto-inflammatoire associé à la cryopyrine (CAPS). Ce syndrome comprend plusieurs maladies dont la sévérité est variable, en fonction de la localisation des mutations dans le gène³²². La plus sévère de ces formes est le syndrome CINCA (chronic infantile neurological cutaneous, articular, parfois appelé NOMID pour Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease), puis le syndrome de Muckle-Wells (MWS), intermédiaire et enfin le syndrome d'urticaire familiale au froid (FCAS). Cette forme est la plus modérée et vaudra à NLRP3 le nom de « cryopyrine ». Ces syndromes sont rares et concernent entre 1 personne sur 360 000 et 1 000 000, dont la qualité de vie peut être grandement altérée. Considérant le rôle central de NLRP3 dans cet ensemble, il a été proposé en 2018 par le journal *Annals of the Rheumatic Diseases*, de renommer la famille de ces maladies NLRP3-AID (pour « NLRP3-associated autoinflammatory disease »)³²³. Ces maladies sont caractérisées par une réaction inflammatoire aigüe, parfois spontanée, mais souvent déclenchée par des stressés physiques extérieurs. La sévérité des symptômes est le principal facteur catégorisant les trois groupes dans lesquels sont classés les patients. Le traitement de ces maladies consiste à bloquer la voie de l'IL-1 β soit par le biais d'un antagoniste du récepteur

(Anakinra, Kineret®) soit par anticorps pour bloquer le récepteur à l'IL-1 β (canakinumab, Ilaris®). Le diagnostic de ces maladies repose sur le tableau clinique, ainsi qu'un séquençage de *NLRP3*.

L'asthme est fortement associé aux Th2, aux macrophages M2 et aux ILC2. Ils maintiennent l'inflammation dans les poumons à travers la sécrétion de diverses cytokines comme l'IL-4 ou 13. NLRP3 et les capases 1 et 8 participent à l'induction de l'asthme, par la sécrétion d'IL-1 β dans les poumons³²⁴⁻³²⁶. En effet, plusieurs études ont prouvé que les aérosols sont capables de déclencher une réponse allergique en activant NLRP3. En plus de l'impact de la sécrétion des cytokines de l'inflammasome, NLRP3 permet aussi, du fait de son interaction avec IRF4, de promouvoir la différenciation des T CD4 en Th2 et des macrophages en M2, amplifiant le phénotype de la maladie³²⁷. De manière logique, la réponse inflammatoire est réduite chez les souris *Nlrp3*^{-/-} dans des modèles allergiques OVA et sérum amyloïde-induits³²⁸. Plus surprenant, il existe peu d'études dans la littérature ciblant l'efficacité des inhibiteurs de NLRP3 dans des modèles d'asthme. Récemment, il a été montré dans un modèle chimio-induit qu'un traitement au MCC950 réduit la sévérité de l'asthme provoqué par l'infiltration des cellules neutrophiles dans les poumons³²⁹. Cependant, une question qui reste en suspens est de savoir s'il est possible de cibler les fonctions de l'inflammasome ainsi que les interactions entre NLRP3 et IRF4, dans l'asthme. Dans un autre contexte impliquant les cellules innées, il a été démontré que l'hypersensibilité cutanée induite au monobenzène est provoquée par l'activation de NLRP3 et la sécrétion d'IL-18, qui permet la génération de NK mémoires dans la peau³³⁰.

En plus d'une phosphorylation anormale de la protéine Tau et d'une accumulation extracellulaire de plaques amyloïdes, la neuroinflammation s'est imposée comme un autre symptôme et/ou cause de la maladie d'Alzheimer³³¹⁻³³³. Cette inflammation est causée par les cellules microgliales, qui sont les cellules immunitaires qui résident dans le système nerveux central. Cette neuroinflammation se traduit par l'activation de ces cellules qui sécrètent des cytokines inflammatoires, dont fait partie l'IL-1 β . Il a été démontré que NLRP3 est activé dans les cellules microgliales durant la phase de génération des dépôts fibreux des plaques amyloïdes^{334,335}. De plus, il semble que l'activation de NLRP3 soit impliquée dans le switch de la structure du tissu nerveux, passant d'un tissu sain à un tissu fibreux^{336,337}. Ces différents résultats montrent que NLRP3 pourrait être intéressant à cibler dans les maladies impliquant de la neuroinflammation, comme Alzheimer.

Dans un autre contexte de maladie touchant le système nerveux central, il a été montré que les Th1 et les Th17 possèdent un rôle fondamental dans la sclérose en plaque humaine et expérimentale murine. Bien que NLRP3 aggrave le phénotype auto-immun de l'EAE à cause de la sécrétion d'IL-1 β ³³⁸⁻³⁴⁰, son rôle dans les T CD4 conduit surprenamment à un effet opposé, diminuant la sévérité de la maladie³¹³. Dans cette étude, les auteurs montrent que les souris sans NLRP3 ou avec un gain de fonction spécifique dans les T CD4 ont un score clinique amoindri de l'EAE. Ainsi, on constate une diminution de la proportion de T CD4 infiltrant le système nerveux central et sécrétant de l'IFN- γ et de l'IL-17, ainsi qu'une diminution de la concentration de ces cytokines. De plus, quand des souris *Rag1*^{-/-} sont

repeuplées avec des T CD4 naïfs ayant un gain de fonction pour NLRP3, l'induction de l'EAE est retardée par rapport aux T CD4 sauvages. Plus curieux, une étude a montré qu'ASC et NLRP3 sont requis pour induire la neuroinflammation dépendante des Th17, par le biais de l'axe caspase-8/IL-1 β . Il est à noter que cet effet ne concerne pas les Th1, soulignant que l'impact de NLRP3 est spécifique aux Th17 et que son rôle diffère en fonction de son partenaire et du sous-type de cellule dans lequel il est exprimé³⁴⁰. Considérant le rôle de NLRP3 dans la différenciation des T CD4 et des macrophages et étant donné l'importance d'IRF4 dans la pathogénicité des Th17 infiltrant dans l'EAE³⁴¹, il serait intéressant de savoir s'il est possible de moduler l'impact négatif de NLRP3 en agissant sur l'axe NLRP3-IRF4 afin de réduire la sévérité des maladies auto-immunes dépendantes de cette voie de signalisation.

5.1.2. Maladies cardiovasculaires et diabète

De manière plus générale, l'inflammation de bas grade est liée à beaucoup de pathologies liées au vieillissement et la prise de poids : hypertension, troubles cardiaques, maladies neurodégénératives etc. Les cellules des vaisseaux sanguins ou les cellules immunitaires les infiltrant peuvent sécréter de l'IL-1 β . Par exemple, la quantité d'IL-1 β est proportionnelle à la sévérité de l'athérosclérose touchant les artères coronaires³⁴². L'IL-1 β et l'IL-18 ont largement été étudiées dans les réponses inflammatoires des cellules vasculaires endothéliales^{343,344}. Des études récentes ont montré que la déficience en IL-1 β ou en IL-18 chez les souris *Apoe*^{-/-} atténue le développement des lésions sclérosantes et que les traitements par anticorps bloquant réduisent la sévérité de ces lésions^{345,346}. De manière assez logique, l'injection intrapéritonéale d'IL-1 β ou d'IL-18 aggrave les lésions sclérosantes, en augmentant la quantité d'IFN- γ dans les vaisseaux³⁴⁷. Ces cytokines sont aussi connues pour induire des dysfonctionnements systoliques et réduire la contractibilité ventriculaire des souris³⁴⁸. Récemment, plusieurs preuves ont mis en lumière le rôle de NLRP3 dans le développement de ces pathologies, notamment une étude qui a montré que la transplantation de moelle osseuse de souris *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-} ou *Il1b*^{-/-} dans des souris *Ldlr*^{-/-} ralentit le développement d'athérosclérose, comparativement aux souris transplantées par de la moelle osseuse sauvage (WT)³⁴⁹. Cependant, ces lésions semblent pouvoir évoluer indépendamment de l'inflammasome dans les souris *Apoe*^{-/-}, avec une progression plus rapide³⁵⁰. Globalement, plusieurs études montrent dans l'athérosclérose une diminution des lésions induites par le régime alimentaire lorsque les souris *Apoe*^{-/-} sont aussi déficientes pour la Caspase-1 ou NLRP3. Cela souligne l'implication de l'inflammasome dans le processus de physiopathologie³⁵¹⁻³⁵³. La sécrétion d'IL-1 β par NLRP3 induit aussi des thromboses inflammatoires lors de régimes alimentaires riches en graisses. Il existe aussi plusieurs corrélations entre l'expression de NLRP3 et la prévalence/sévérité des maladies cardiovasculaires. Par exemple, l'expression de NLRP3 dans les tissus de l'aorte est plus élevée chez les patients ayant des plaques d'athérome dans la carotide ou dans les artères coronaires^{354,355}. Comme déjà mentionné, NLRP3 joue aussi un rôle dans la fibrose et le remodelage tissulaire. Ces deux mécanismes sont des facteurs importants dans le développement des insuffisances cardiaques. En effet, après un infarctus du myocarde, NLRP3

est connu pour son rôle négatif dans la cicatrisation du tissu cardiaque dont sa délétion atténue ces effets^{356,357}. Ensemble, ces études suggèrent un rôle important de NLRP3 dans l'apparition et la sévérité des maladies cardiovasculaires. Ces résultats ont conduit à plusieurs essais cliniques testant l'effet d'antagonistes de l'IL-1 β ou d'inhibiteurs de l'inflammasome. En date, la colchicine semble par exemple réduire le risque d'événements cardiovasculaires chez les patients présentant des maladies coronariennes^{358,359}. Après les premiers symptômes associés à un infarctus du myocarde avec décalage du segment ST, le traitement par Anakinra a montré un intérêt dans la réduction des séquelles cardiaques subsidiaires ainsi qu'une diminution du nombre d'hospitalisations³⁶⁰. Enfin, le Canakinumab, un autre inhibiteur de l'IL-1 β , a lui aussi montré un intérêt dans la prise en charge des infarctus du myocarde^{361,362}.

Toujours en lien avec les maladies du métabolisme, plusieurs indices montrent que NLRP3 est relié au diabète. Les souris déficientes pour NLRP3 sont en effet moins susceptibles de développer un diabète de type 1^{363,364}. En plus du type 1, NLRP3 est aussi impliqué dans le développement du diabète de type 2, en participant à l'insulinorésistance médiée par les macrophages à la suite de leur stimulation par l'IL-18 et l'IL-1 β ³⁶⁵. De surcroît, les souris *Nlrp3*^{-/-} ont tendance à être protégées de l'insulinorésistance provoquée par l'obésité, suggérant que NLRP3 pourrait être une cible thérapeutique à envisager dans la prise en charge du diabète de type 2.

5.1.3. NLRP3 et cancer : allié ou ennemi ?

Dans le cancer, l'effet de NLRP3 a principalement été étudié à travers le prisme de l'effet de l'IL-1 β . Ses répercussions sur le cancer sont complexes, comme nous l'avons décrit précédemment, car les rôles de l'IL-1 β dans la promotion ou l'inhibition du cancer sont ambigus. Concernant ses rôles indépendants de l'inflammasome, plusieurs articles font état des rôles de NLRP3 favorisant la croissance tumorale médiée par l'immunosuppression des macrophages de type M2. Il a été montré que le MCC950, inhibiteur direct de l'inflammasome, ralentit la croissance tumorale dans un modèle de cancer tête et cou chez la souris, en diminuant l'infiltration de MDSC, des Treg et des macrophages associés aux tumeurs³⁶⁶. Il serait intéressant de comprendre le contexte dans lequel bloquer ou activer l'inflammasome afin d'obtenir l'effet antitumoral le plus efficace possible. Comme décrit précédemment, NLRP3 possède un rôle important dans la différenciation des cellules Th2. Les Th2 sont décrits comme pro-tumoraux dans plusieurs sous-types de cancers^{367,368}. Etant donné que NLRP3 promeut la différenciation en Th2, il est tout à fait envisageable qu'à travers les Th2, NLRP3 joue un rôle pro-tumoral dépendant cette fois de son rôle indépendant de l'inflammasome. De plus, NLRP3 promeut aussi les Th17 régulateurs dont le profil fait d'eux, *de facto*, des cellules pro-tumorales dont nous déjà parlé. Ces résultats soutiennent le fait que les fonctions indépendantes de l'inflammasome immunosuppressives de NLRP3 le conduisent à jouer un rôle pro-tumoral, favorisant le développement et la croissance des tumeurs. Cependant, son rôle global dépend fortement du type de cancer et de son stade évolutif. L'expression de NLRP3 par les cellules tumorales semble être aussi un facteur à prendre en compte dans la réponse aux thérapies. Il a été montré dans un modèle de mélanome muté BRAF^{V600E} que les

anticorps anti-PD1 restaurent la production d'IFN- γ par les T CD8, mais induisent conjointement la surexpression de PD-L1 et de NLRP3 par les cellules tumorales. Les expériences menées *in vitro* et *in vivo* sur NLRP3 en l'inhibant génétiquement ou pharmacologiquement, ont montré que le relargage d'HSP70 est dépendant de l'activation de NLRP3 dans les cellules tumorales^{369,370}. HSP70 est ensuite capable d'activer la voie TLR4 des cellules tumorales et d'induire la voie Wnt5a, responsable à son tour de la sécrétion de la chimiokine CXCL5 par les cellules de mélanome. Cette sécrétion induit ensuite le recrutement des MDSC³⁷¹⁻³⁷⁴. Les données dans la littérature confirment ce rôle de résistance à l'immunothérapie conféré par l'expression de NLRP3, capable d'induire le recrutement de cellules immunosuppressives, qui expriment elles-mêmes NLRP3. Dans un contexte thérapeutique, certaines chimiothérapies participent à l'activation de NLRP3 dans les MDSC et la sécrétion d'IL-1 β provoque la production d'IL-17 par les T CD4, réduisant l'efficacité de la chimiothérapie³⁷⁵. Ainsi, un des enjeux de l'étude des fonctions indépendante de l'inflammasome de NLRP3 est comprendre quels mécanismes il faut favoriser et lesquels il faut inhiber de sorte à maximiser la réponse antitumorale.

Objectif du travail de thèse

Les travaux de l'équipe ont pour but de comprendre comment fonctionne le système immunitaire au sein des tumeurs afin de mieux appréhender et d'améliorer la réponse immunitaire antitumorale. Dans ce contexte, l'équipe a développé une forte expertise dans l'étude des cellules myéloïdes et de NLRP3, ainsi que dans l'étude de la différenciation lymphocytaire, de la communication intercellulaire et l'analyse des infiltrats tumoraux. C'est en puisant dans l'ensemble de ces domaines que j'ai réalisé mon travail de thèse sur les fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes T.

NLRP3 est une protéine décrite pour former l'inflammasome dans les cellules myéloïdes, où elle active la caspase-1 et permet la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18. Les études récentes sur NLRP3 montrent que ses fonctions sont en réalité plus variées.

Les derniers articles scientifiques s'intéressant aux rôles indépendants de l'inflammasome de NLRP3 démontrent que les connaissances concernant ces fonctions sont largement incomplètes. Les travaux précédents de l'équipe ont montré que NLRP3 est exprimé dans les lymphocytes T CD4 à la suite de l'activation du récepteur à l'IL-2 par son ligand. NLRP3 est alors capable d'agir en tant que facteur de transcription en s'associant à IRF4, dans les lymphocytes Th2.

Des données préliminaires obtenues au laboratoire ont mis en évidence que le sous-type Th2 n'est pas le seul pouvant être affecté par NLRP3 mais que d'autres sous-types jouant un rôle majeur dans la progression tumorale sont aussi impactés. Ainsi, le premier objectif de ces travaux de thèse a été :

De définir comment l'implication de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4 peut impacter la croissance et le développement de tumeurs.

Dans un second temps, fort de l'observation que NLRP3 est induit par l'IL-2 dans les lymphocytes T CD4, nous nous sommes intéressés au rôle de NLRP3 dans les lymphocytes T CD8. Ces cellules exprimant le récepteur à l'IL-2, la question qui s'est naturellement posée et qui est le second objectif de la thèse a été :

D'étudier l'impact de NLRP3 sur la biologie des lymphocytes T CD8 et sur leurs activités antitumorales.

Article 1

NLRP3 régule la transdifférenciation des lymphocytes Th17 par le truchement de fonctions indépendantes de l'inflammasome

T. Accogli*, C. Hibos*, J. Melin, E. Humblin, R. Mary 2, A. Bernard, F. Chalmin, M. Bruchard, C. Richard, S. Macedo, S. Lerouge, S. Chevrier, A. Garcia, E. Jacquin, C. Paul, B. Ryffel, L. Apetoh, R. Boidot, F. Ghiringhelli, and F. Vegran.

INTRODUCTION

Les lymphocytes Th17 sont des lymphocytes T CD4 auxiliaires impliqués dans la réponse contre les bactéries et les champignons. Ils ont été découverts par l'étude des maladies auto-immunes, notamment l'EAE (un modèle d'étude murin de la sclérose en plaque), mais aussi l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux.

Classiquement, pour se différencier en Th17, les T CD4 naïfs ont besoin des signaux classiques d'activation des T, ainsi que d'un signal cytokinique. Suivant les cytokines présentes dans l'environnement, les Th17 auront un profil immunosuppresseur et régulateur, sécrétant de l'IL-10, de l'IL-22 et exprimant les ectonucléotidases (Th17r, différenciés *in vitro* à partir d'IL-6 et de TGF- β), ou un profil inflammatoire, sécrétant de l'IL-17, du GM-CSF et de l'IFN- γ (Th17i, différenciés *in vitro* à partir d'IL-6, d'IL-1 β et d'IL-23).

Cette dualité leur confère une ambivalence dans la réponse immunitaire antitumorale, où un profil inflammatoire est généralement un facteur de bon pronostic, alors qu'un profil régulateur participera au développement des tumeurs, à cause de leur caractère immunosuppresseur. Le microenvironnement tumoral étant riche en TGF- β , les Th17 infiltrants tendent à acquérir un phénotype régulateur, même si les données de la littérature sont encore ambivalentes⁴.

Bien que NLRP3 soit impliqué dans l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 β , il a été montré précédemment au laboratoire qu'il est aussi un facteur clé de la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en Th2, en faisant partie du complexe NLRP3/IRF4, nécessaire à la mise en place du programme transcriptionnel des Th2.

Au cours de l'étude concernant le rôle de NLRP3 dans les Th17, une analyse globale de l'expression des gènes par séquençage d'ARNm a permis de montrer que les Th17 régulateurs murins *Nlrp3*^{-/-} possèdent un phénotype se rapprochant des Th17 inflammatoires, surexprimant notamment l'IFN- γ . Cet effet a été confirmé lors de croissances tumorales, avec un ralentissement de la croissance dans les lignées CD4^{cre} *Nlrp3*^{flox/flox}, en lien avec les Th17.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes responsables des effets observés dans les Th17r *Nlrp3*^{-/-}.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Souris, croissances tumorales et traitements

Les souris C57BL/6J proviennent des laboratoires Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Les souris OT-II, OT-II *Nlrp3*^{-/-}, *Nlrp3*^{-/-}, *CD4*^{cre} x *Nlrp3*^{flox/flox}, *CD4*^{cre}ERT2 x *Nlrp3*^{flox/flox}, proviennent de l'élevage du CDTA (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal ; Orléans, France) ainsi que les souris C57BL6 Ly5.1a et OT-I (généreusement fournies par le Pr. Apetoh). Les souris *CD4*^{cre} x *Rorc*^{flox}, *Asc*^{-/-}, *Ice*^{-/-}, *Il1b*^{-/-} et *Il18*^{-/-} ont été généreusement fournies par le Pr. Ryffel. Les souris *Rorc*^{-/-} proviennent des laboratoires Jackson (Bar Harbor, USA) dont l'élevage se situe sur notre site. Tous les animaux ont été traités et élevés conformément aux recommandations de la FELASA et du comité d'éthique en expérimentation animale (Université de Bourgogne, France). Les souris utilisées pour les expériences sont des souris femelles et mâles âgés de 6 et 10 semaines.

Pour induire la formation de tumeurs sous-cutanées, 3.10^5 cellules de mélanome B16F10, de cancer du poumon TC1 ou de cancer du poumon LLC1 ont été injectées. Les lignées cellulaires venant de l'ATCC ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté par 10% (vol/vol) de sérum de veau fœtal (SVF), 1% (vol/vol) de Pénicilline Streptomycine Amphotéricine B (PSA) et 4 mM d'acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique (HEPES). Les tumeurs ont été mesurées tous les 3 jours à l'aide d'un pied à coulisse. Pour induire des tumeurs pulmonaires, 2.10^5 cellules de mélanome B16-OVA ont été injectées par voie intraveineuse. Les foyers tumoraux ont été dénombrés 13 jours post-injection.

Les traitements par anticorps bloquants (Table supplémentaire S1) ont été réalisés par injections intra-péritonéales (IP) 3 fois par semaine, avec 200µg d'anti-IL-4 (clone 11B11), anti-CD8 (YTS169.4), anti-NK1.1 (clone PK136), anti-CD25 (clone PC-61.5.3) ou d'IgG1 (clone MOPC-21). Pour le traitement par immunothérapie, les souris ont reçu 200 µg d'anti-PD-1 (clone 29F.1A12) ou de son contrôle isotypique (clone 2A3). Les liposomes au chlodronate inhibant les macrophages ainsi que l'inhibiteur de NLRP3 MCC950 (Merck) ont été injectés deux fois par semaine en IP, pour respectivement 1mg/souris et 30µg/souris. La digoxine, inhibitrice de RORγt (ref 4583, Tocris, R&D systems), a été injectée en IP tous les jours à hauteur de 20µg/souris. Les souris ont été gavées tous les jours pendant 5 jours avec soit du tamoxifène (4 mg/souris, ref 13258, Bertin Bioreagent) préalablement dissout dans de l'huile de maïs mélangée à du DMSO (2% vol/vol), soit l'huile seule comme contrôle.

Purification et différenciation *in vitro* des lymphocytes T

Les cellules murines ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 avec 10% (vol/vol) de sérum de veau fœtal et supplémenté avec des acides aminés non-essentiels, du sodium pyruvate,

des antibiotiques (PSA) et 4mM d'HEPES. Les cellules murines T CD4⁺ naïves (CD4⁺, CD62L⁺, CD44⁻) isolées à partir de rates et de ganglions ont été purifiées grâce au kit de séparation magnétique MACS (Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse, MiltenyiBiotec®). La pureté des cellules T CD4 extraites a été contrôlée par cytométrie en flux et est supérieure à 95%. Les lymphocytes T CD4 sont stimulés dans les plaques de culture par des anticorps de revêtement dirigés contre CD3 (145-2C11, 2 µg/ml) et CD28 (PV-1, 2 µg/ml) en présence d'IL-12 (10ng/mL) et d'anticorps anti-IL-4 (11B11, BioXcell, 10 µg/mL) pour la différenciation en Th1, d'IL-4 (10ng/mL) et d'anti IFN-γ (XMG1.2, BioXcell, 10µg/mL) pour la différenciation en Th2, de TGF-β (4ng/mL) et d'anti-IL-4 et anti-IFN-γ pour la différenciation en Treg, de TGF-β (2 ng/ml)d'IL-6, d'IL-1β (20 ng/mL) et d'IL-23(25 ng/mL) pour la différenciation en Th17 pathogéniques ou d'IL-6 (20 ng/mL) et de TGF-β (2ng/mL) pour la différenciation en Th17 régulateurs. Toutes les cytokines utilisées proviennent de MiltenyiBiotec®. Quand précisé dans le texte, les cellules ont été prétraitées pendant une heure avant stimulation par du Z-VAD (50µM, Selleckchem), Z-IETD-FMK (50µM, Selleckchem), MCC950 (10µM, Merck), Anakinra (300nM, MedChemExpress), SIS3 (10µM, Merck), LY294002 (325 nM, Selleckchem), SB203580 (10µM, Selleckchem), Y27632 (10µM, Seleckchem), JNK Inhibitor II (10µM, Merck), ou par IFN-γ recombinant murin (research grade, MiltenyiBiotec®).

Immunofluorescence (IF) et expérience de ligation par proximité (PLA)

1.10⁶ cellules sont lavées et fixées pendant 10min à température ambiante (RT) avec une solution de paraformaldéhyde (PFA, 4%), puis perméabilisées pendant 10min sur glace par du méthanol glacial pur. Afin de saturer les sites de fixation aspécifiques, les cellules incubent pendant 1h à RT dans du PBS 1X, supplémenté par 5% (vol/vol) de SVF. Les échantillons sont incubés sur la nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-NLRP3/NALP3 (1/100^{eme}mAb, Cryo-2, Adipogen), ou anti-SMAD3 (1/50^{eme}CellSignalingTechnology), ou anti-phospho-SMAD3 (1/100, Ser423/425, CellSignalingTechnology), ou anti-TGFβRI (1/50, Sigma Aldrich), ou anti-IRF4 (1/100, clone D9P5H, CellsignalingTechnology). Tous les anticorps ont été dilués dans du PBS 1X, 5% SVF. Les anticorps contrôles utilisés dans les expériences d'imagerie sont des isotypes IgG contrôles murins ou lapins (Thermofisher Scientific).

Pour l'immunofluorescence, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X, SVF 5%, puis incubées avec un anticorps secondaire dans le même tampon. Elles sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS 1X, SVF 5% puis deux fois dans de l'eau ultrapure.

Pour les PLA, les cellules ont été incubées 30min à 37°C avec les sondes appropriées (Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit PLUS et Anti-Mouse MINUS, Sigma Aldrich), puis 1h et 40min avec la solution contenant la polymérase, conformément au protocole constructeur.

Pour les deux expériences, les cellules marquées ont été déposées sur des lames de microscopie (Superfrost Ultra Plus®, ThermoFisher Scientific), et incubées à RT pendant la nuit, jusqu'à évaporation du milieu. Les lames ont été montées par une goutte de Milieu de montage anti-atténuation Gold contenant du DAPI (ref : P36935, ProLong™Thermofisher

Scientific). Les lames ont été lues au microscope (Axio Imager – M2 microscope (Zeiss) puis les images analysées *via* le logiciel Zeiss et Icy.

Analyse par PCR quantitative

Les ARN messagers totaux ont été extraits par Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 300ng d'ARNm ont été rétro-transcrits en ADNc par le kit TAKARA (PrimeScript™ RT Master Mix Perfect Real Time). Les ADNc ont été quantifiés par PCR quantitative en temps réel *via* un kit PCR contenant du SYBR Green (AppliedBiosystems) sur la machine ViiA7 (ViiA 7 Real-Time PCR System, Thermofisher Scientific). Les quantités relatives d'ARNm ont été calculées par la méthode du fold change correspondant au $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ par rapport au gène de ménage de la β -actine (*Actb*) ou de la GAPDH (*Gapdh*) (ΔCt) et d'un calibrateur biologique ($\Delta\Delta Ct$), le calibrateur étant l'échantillon auquel tous les autres sont comparés (à savoir l'échantillon « non traité » ou « temps zéro »).

Cytokine, ATP, AMP et mesure de la glycolyse

Les cytokines sécrétées ont été dosées par ELISA pour l'IL-1 β , l'IFN- γ et le GM-CSF murins (BD Biosciences) selon les recommandations du fabricant.

Pour les dosages d'AMP/ATP, les cellules ont été placées dans du milieu RPMI sans rouge de phénol (Seahorse XF RPMI, Agilent) supplémenté par 10mM de glucose (Seahorse XF Glucose, Agilent), 1mM de Pyruvate (Seahorse XF Pyruvate, Agilent) et 2mM de L-glutamine (Seahorse XF L Glutamine, Agilent). La quantité d'ATP et d'AMP a été déterminée grâce au kit constructeur « The CellTiter-Glo® Luminescent CellViabilityAssay » de Promega®.

Afin d'évaluer la glycolyse, les cellules ont été placées dans le même milieu RPMI supplémenté etensemencées dans des cartouches contenant 96 puits (Seahorse XF sensor Cartridge, Agilent), puis centrifugées. Le mélange Rotenone/ Antimycin et 2-DG a été ajouté dans les puits selon les recommandations du constructeur. La glycolyse a ensuite été mesurée grâce au kit « SeahorseGlycolytic Rate Assay » *via* l'analyseur Seahorse XFe96 (Agilent).

Cytométrie en flux

Les cellules marquées ont été analysées sur le cytomètre Fortessa (BD) puis les données ont été analysées par le logiciel FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA). Les cellules ont été étudiées après le temps et les traitements indiqués dans les figures. Les échantillons ont été découpés en petits fragments (<0.5mm) suivi d'une dissociation enzymatique par la machine gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters Miltenyi® selon les recommandations du fournisseur (Tumor dissociation kit, Miltenyi). Les lysats ont été passés sur filtre (70 μ m) et lavés avec du PBS 1X. Les lysats ont été enrichis en cellules CD45⁺ grâce au kit « CD45TIL Microbeads, mouse » et aux colonnes magnétiques de Miltenyi® Biotec. Après centrifugation, les suspensions cellulaires ont été incubées 3h à 37°C dans du RPMI supplémenté avec 0.2% du kit « Cell Stimulation Cocktail plus protein transport inhibitors » (ref: 00-4975-

93,eBioscience). Les cellules ont ensuite été marquées par des anticorps ciblant des protéines membranaires dans un tampon de marquage (Flow Cytometry Staining Buffer, ref : 00-422-26, eBioscience). Les anticorps utilisés sont : CD4-V500 (clone RM4-5, BD), CD4-BUV395 (GK1.5, BD), CD45-BUV395 (30-F11, BD), CD45-Viogreen (REA737, Miltenyi), CD8a-PercP-Cy5.5 (53-6.7, BD), CD8a-BUV805 (53-6.7, BD), CXCR3-APC (REA724, Miltenyi), CCR4-PE (2G12, Biolegend), CCR6-BV605 (29-2L17, Biolegend), CD25-AF700 (PC61, Biolegend), CD127-BV421 (BD), CD39-PE-Cy7 (24DMS1, eBioscience), CD73-PE (TY/11.8, Biolegend), et CD45.2-FITC (104, BD). Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées grâce au kit « FoxP3 staining buffer set » (Miltenyi) puis marquées avec des anticorps ciblant les protéines intracellulaires. Les anticorps utilisés sont : IFN γ -BV421 (XMG1.2, Biolegend), Foxp3-PercP-Cy55 (FJK-16s, eBioscience), ROR γ t-APC (AFKJS-9, eBioscience), Ki67-BV605 (16A8, Biolegend), Granzyme B-FITC (REA226, Miltenyi), TNF α -BV510 (MP6-XT22, Biolegend) et STAT1pY701-PE (REA159, Miltenyi). Toutes les expériences incluent un marqueur de viabilité (Fixable Viability Stain, BD). Le tri cellulaire, quant à lui, a été réalisé grâce au trieur ARIAII (BD).

Séquençage d'ARNm (RNA-seq)

Les ARNm totaux ont été extraits en utilisant du Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les ARN ribosomiques ont été retirés à l'aide du kit « Ribo-zero RNA Removal Kit » (Illumina, San Diego, CA, USA). 100ng de ces ARNr ont été utilisés pour préparer les banques grâce au kit « TruSeq Stranded Total RNA Library Prep kit » (Illumina), conformément aux instructions du fournisseur. Le séquençage des ARNm a été réalisé par l'appareil NextSeq (Illumina). Les banques du RNA-seq ont été séquencées par la méthode de « paired-end 75 bp reads ». Les fichiers FASTQ ont été alignés en utilisant BWA pour Illumina sur la version mm10 du génome de *Mus Musculus*. L'analyse a été faite par TopHat pour Illumina. Les fichiers générés ont été analysés par Cufflinks, afin d'obtenir l'annotation des gènes exprimés dans les différents sous-types étudiés. Enfin, l'expression différentielle de ces gènes a été analysée avec Cuffdiff.

Expériences de cytotoxicité et d'immunosuppression

Afin d'évaluer la cytotoxicité des Th17, la survie de cellules de mélanome exprimant le peptide de l'ovalbumine (B16-OVA) a été évaluée en présence de Th17 OT-II (ciblant le peptide OVA) ou OT-II *Nlrp3*^{-/-}, différenciés à partir de T CD4 naïfs. Les cellules ont été ensemencées en plaques 24 puits selon un ratio décroissant de cellules B16-OVA/Th17 pendant 24h. La viabilité des cellules a ensuite été évaluée par cytométrie en flux, après marquage (FVS, CD4). Afin d'évaluer la cytotoxicité des T CD8, la survie de cellules de mélanome B16F10 a été évaluée en ensemencant à un ratio 1/1 des cellules B16F10 avec des T CD8 extraits de tumeurs issues de souris sauvages ou CD4^{cre} x *Nlrp3*^{flox/flox}. La mort cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux via un marquage Annexine V/DAPI. Afin d'évaluer l'activité immunosuppressive des Th17r, des T CD8 totaux ont été extraits de rates et de ganglions de souris OT-I (ayant des T CD8 ciblant le peptide OVA) en utilisant le kit « CD8a (Ly-2) Microbeads » (Miltenyi), puis ensemencés dans du milieu complet supplémenté par le peptide SIINFEKL (2 μ g/ml) avec une

quantité croissante de Th17-OTII WT ou *Nlrp3*^{-/-} dans des plaques revêtues d'anticorps anti-CD3/CD28. Après 24h de co-culture, les cellules ont été récupérées et la production de cytokines analysées par cytométrie en flux.

Expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

La chromatine a été fragmentée à l'aide du kit « truChIP™ ChromatinShearing Kit » et du sonicateur « Focused-Ultrasonicator M220 » (Covaris). La précipitation de la chromatine a été réalisée selon les recommandations du fournisseur grâce au kit ChIP-IT (Active Motif Europe, Rixensart, Belgium) avec 1 µg d'anticorps ciblant pSMAD3 (Ser423/425, C25A9, CellSignalingTechnology), ou 1 µg de d'immunoglobuline G de lapin (IgG) en contrôle négatif. La précipitation de l'ADN a été évaluée par qPCR grâce aux amorces suivantes :

Ifng 5'-CCTTGGGTGTGTTGAGTGAA-3' et 5'-AAAAAGCCAATGTGGTGAGG3'

Csf2 5'-GGCTACTCCCATTTGACTGC-3' et 5'-CAGCCTCAGAGACCCAGGTA-3'

Tnf 5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3' et 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'.

Analyses statistiques

Les résultats sont représentés avec la moyenne ± l'écart-type (SD) ou l'erreur standardisée à la moyenne (SEM), les données ont été comparées en utilisant le test de Mann-Whitney (groupe contre groupe contrôle) ou par analyse de la variance à un ou deux facteurs (1/2-way ANOVA) si nécessaire. Les différences dans les foyers tumoraux ont été analysées par le test de Kruskal-Wallis, selon le nombre de groupe. Les calculs de significativité ont été faits par GraphPadPrism. Toutes les p-values ont été calculées en two-tailed et un résultat significatif correspond à un $p < 0.05$ pour toutes les expériences.

RÉSULTATS

1. NLRP3 est impliqué dans la différenciation des lymphocytes Th17

Dans des travaux précédents, l'équipe a démontré le rôle de NLRP3 dans la différenciation des lymphocytes Th2 (Bruchard *et al.*, 2015). Afin de tester le rôle de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4, nous avons généré des souris *Nlrp3^{flox/flox}*. Les souris sont floxées pour le gène *Nlrp3* au niveau de l'exon 4, en utilisant le système Cre-loxP. Ces souris ont été croisées avec des souris *CD4^{cre}*. L'enzyme de la Cre-recombinase retire l'exon 4 du gène de *Nlrp3*, introduisant un codon stop prématuré dans les cellules T CD4 (figure 1).

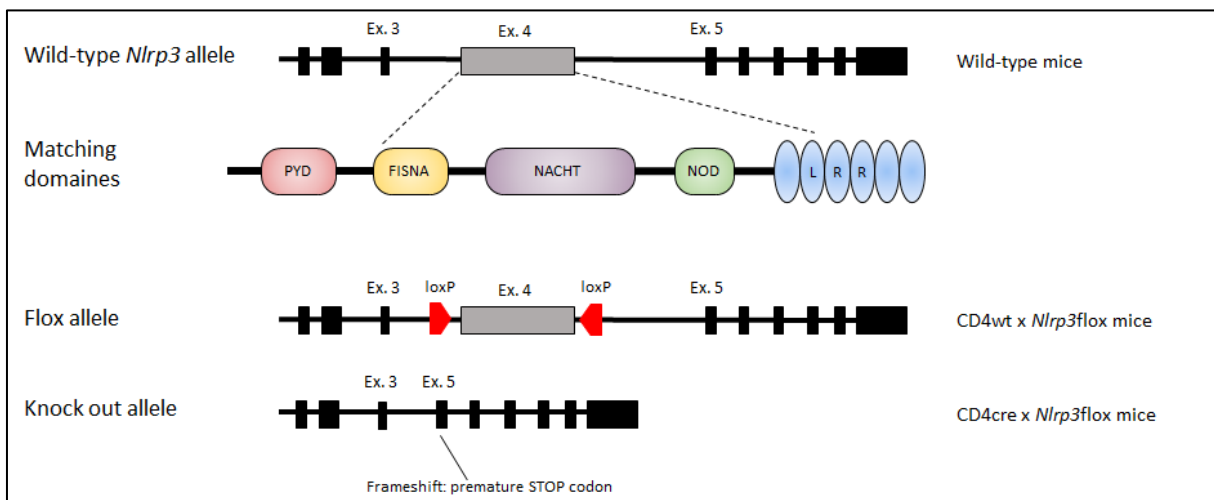


Figure 1 : Génération des souris *CD4^{cre} Nlrp3^{flox/flox}*

Schéma du gène *Nlrp3* sauvage, floxé et KO. Les lignes représentent les introns, les rectangles noirs les exons et les flèches rouges les sites loxP.

Nous avons validé la déficience en NLRP3 par immunofluorescence, en comparant l'expression de NLRP3 dans des lymphocytes CD4 Th2 différenciés à partir de T CD4 naïfs provenant de souris *Nlrp3^{-/-}*, *CD4^{cre} Nlrp3^{flox/flox}* (que nous appellerons par la suite *CD4 Nlrp3^{-/-}*) ou sauvages. Nous avons montré que les Th2 n'exprimant pas NLRP3 expriment beaucoup moins *Gata3*, le facteur de transcription spécifique des Th2, mais aussi *Il4*, la cytokine qu'ils produisent en majorité (figure 2b).

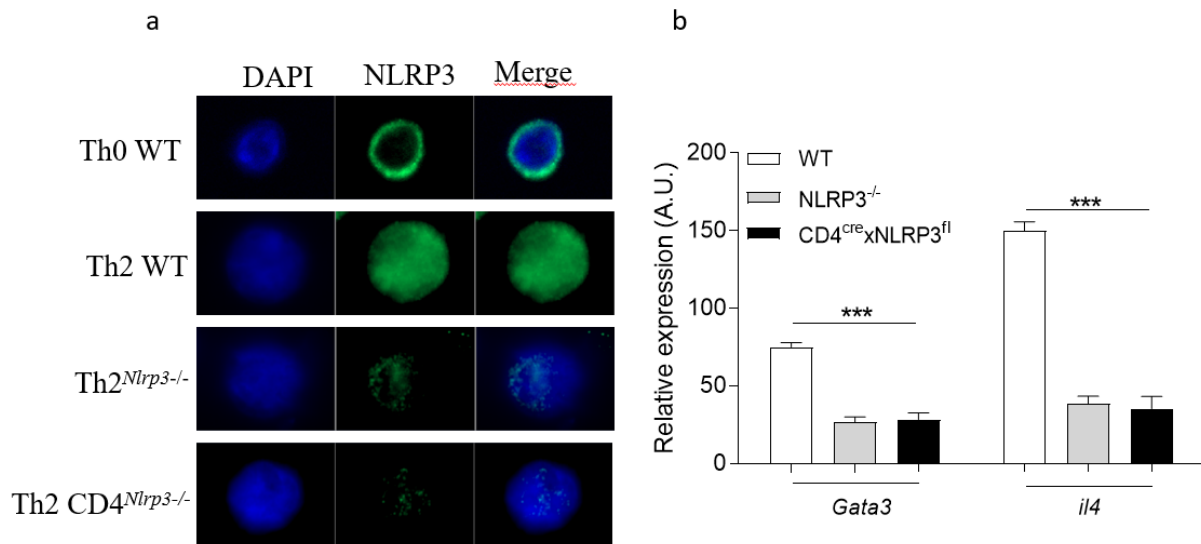


Figure 2 : Validation du modèle de souris CD4cre *Nlrp3* flox.

Images de microscopie par fluorescence de Th2 sauvages, *Nlrp3*^{-/-} ou T CD4 *Nlrp3*^{-/-} après 24h de différenciation *in vitro*. Le noyau (bleu) a été marqué au DAPI, et NLRP3 (vert) par anticorps couplé à l'AF488 (a). Comparaison de l'expression des ARNm de *Gata3* et de *Il4* dans les cellules CD4 naïves par rapport au gène de ménage (*Actb*) entre des souris sauvages (WT) et des souris *Nlrp3*^{-/-} ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} après 24h de différenciation *in vitro* en Th2. La significativité statistique entre WT et le reste des conditions a été établie par 1-way ANOVA ***p<0.005 (b), n=3.

Pour comprendre l'effet de NLRP3 sur le comportement des cellules T CD4, nous avons isolé des cellules T CD4 naïves de souris CD4 *Nlrp3*^{-/-} ou de leur contrôle et nous les avons différenciées *in vitro* en Th1, Th2, Th17, et Treg afin d'analyser par RT-qPCR l'expression de leur facteur de transcription clé ainsi que leurs cytokines. D'abord, nous avons confirmé l'inhibition montrée par Bruchard *et al.*, 2015, des Th2, comme montré par la réduction de l'expression de *Gata3* et de *Il4* (figure 3).

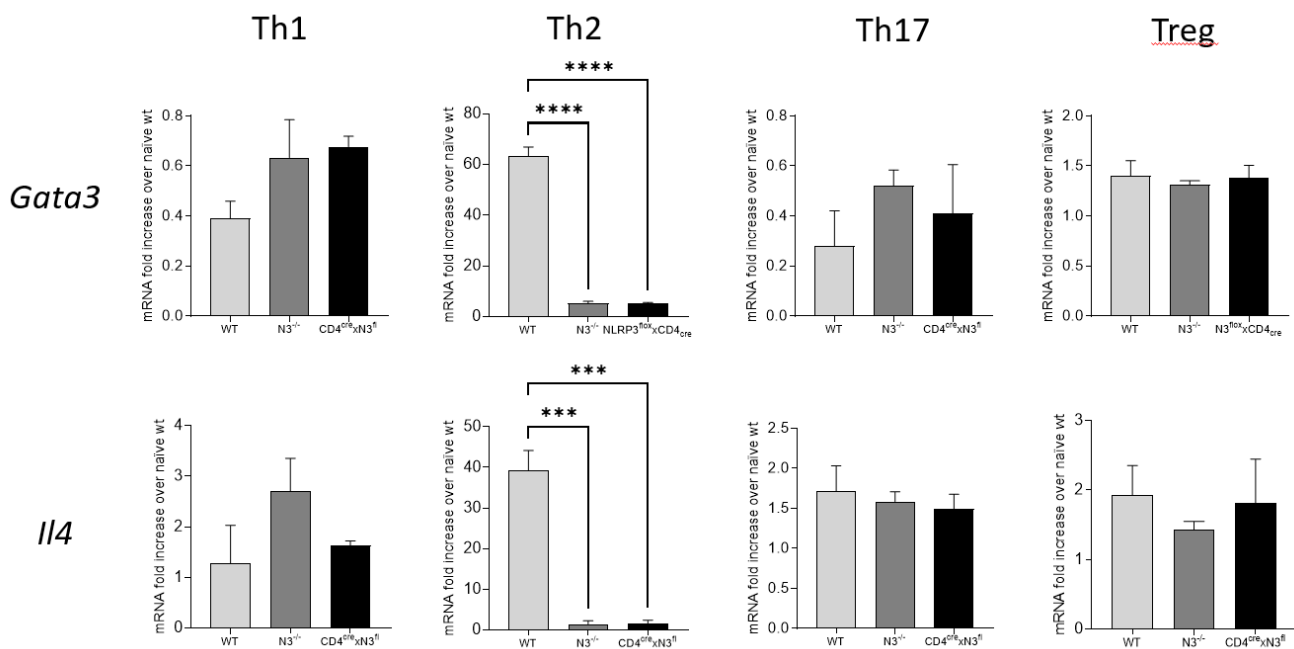


Figure 3 : Impact de la déficience en NLRP3 sur l'expression de *Gata3* et *Il4* dans les différents sous-types de T helper.

Analyse de l'expression de *Gata3* et *Il4* par RT-qPCR dans les lymphocytes T CD4 naïfs *Nlrp3*^{-/-} et *CD4* *Nlrp3*^{-/-} par rapport au gène de ménage *Actb*, dans des souris WT après 24h de différenciation *in vitro* en Th1, Th2, Th17 ou Treg. La significativité statistique a été établie par 1-way ANOVA ***<0.005, ****<0.001, n=3.

Ensuite, nous avons observé que les Th17 sont impactés par la déficience en NLRP3. En effet, nous avons montré une augmentation de l'expression en ARNm ainsi que de la production d'IFN- γ chez les Th17 déficients pour NLRP3 (figure 4a-c).

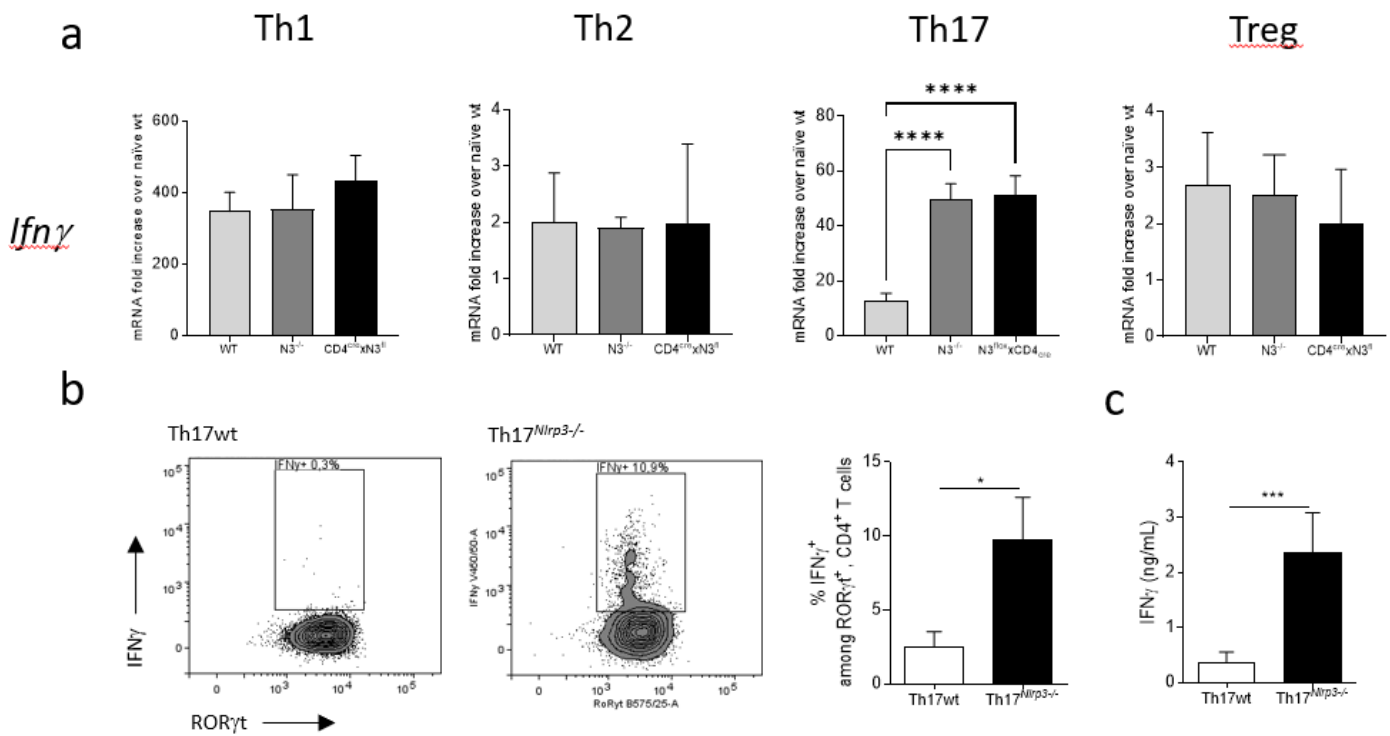


Figure 4 : Impact de la déficience en NLRP3 dans les Th17.

Comparaison de l'expression de *Ifn γ* par RT-qPCR par rapport au gène de ménage *Actb*, entre les lymphocytes T CD4 naïfs *Nlrp3*^{-/-} (total) et CD4 *Nlrp3*^{-/-} par rapport aux WT après 24h de différenciation *in vitro* en Th1, Th2, Th17 ou Treg (a). Analyse de la production d'IFN- γ de Th17 différenciés *in vitro* pendant 72h à partir de T CD4 naïfs WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} par cytométrie en flux (b). La quantification d'IFN- γ a été réalisée par ELISA dans les mêmes conditions (c). La significativité statistique a été évaluée entre WT et le reste des échantillons par des tests de Mann-Whitney *p<0.05 et ***p<0.005 et ****p<0.001, n=3).

Afin de tester le rôle de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4 pendant la croissance de tumeurs, nous avons comparé la croissance de différents modèles de tumeurs transplantables en sous-cutané (mélanome B16F10 et cancer des poumons LLC1), chez des souris WT ou bien CD4 *Nlrp3*^{-/-}. Nous avons observé que la déficience en NLRP3 dans les lymphocytes T CD4 diminue la croissance des tumeurs B16F10 et LLC1. De plus, l'anticorps bloquant anti-IL-4 n'a pas (LLC1) ou moins (B16F10) affecté la croissance des tumeurs LLC1 et B16F10 (figure 5a, b), suggérant que le ralentissement des croissances tumorales chez les souris CD4 *Nlrp3*^{-/-} n'est pas attribuable uniquement au rôle de NLRP3 dans la différenciation et la production d'IL-4 des lymphocytes Th2.

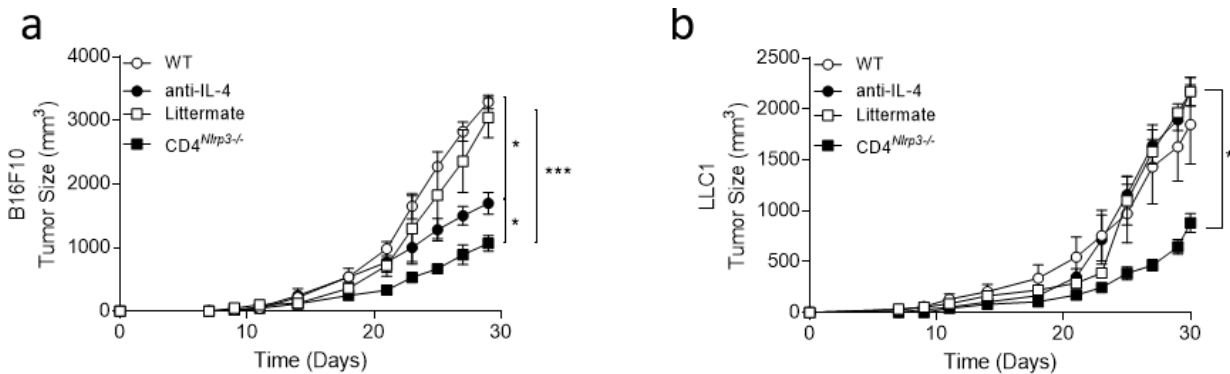


Figure 5 : Analyse du rôle de NLRP3 dans la croissance de tumeur B16F10 et LLC1.

Croissance tumorale de tumeurs B16F10 (a) ou LLC1 (b) chez des souris C57Bl6 WT traitées ou non par anticorps bloquants anti-IL-4 et CD4 *Nlrp3*^{-/-} et leur contrôle. La significativité statistique a été évaluée par un test 2-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey * $p < 0.05$ et *** $p < 0.005$, $n = 5$ souris.

NLRP3 est principalement décrit pour son rôle dans la formation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18. La production d'IL-1 β est équivalente dans les tumeurs issues de souris CD4 *Nlrp3*^{-/-}, comparé aux souris contrôles, tandis que l'IL-1 β est totalement abolie chez les souris *Nlrp3*^{-/-} (figure 6a). Contrairement aux macrophages, les lymphocytes T CD4 isolés de souris WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} ne sécrètent pas d'IL-1 β ou d'IL-18 après avoir été traités par des activateurs classiques de NLRP3 (LPS et ATP, figure 6b). Nous n'avons montré aucune augmentation d'expression de l'*Ifn* γ dans les Th17 différenciés *in vitro* à partir de T CD4 naïfs isolés de souris déficientes pour *Asc*, *Ice*, *Il1r1* et *Il18r* (figure 6c). De même, l'inhibition de l'inflammasome par le biais d'inhibiteurs de Caspase-1 (ZVAD), Caspase-8 (ZIETD), de l'inflammasome (MCC950) ou d'Anakinra (inhibiteur de l'IL-1RA) durant la différenciation des Th17 *in vitro* n'a pas augmenté la production et l'expression de l'*Ifn* γ , contrairement à la déficience en *Nlrp3* dans les Th17 (figure 6d). De même, nous n'avons montré aucune augmentation d'expression de l'*Ifn* γ dans les Th17 différenciés *in vitro* à partir de T CD4 naïfs isolés de souris déficientes pour *Asc*, *Ice*, *Il1r1* et *Il18r* (figure 6c). De plus, traiter *in vivo* les souris par du MCC950 n'a eu aucun effet sur la croissance des tumeurs B16F10 et LLC1, comparé aux souris non traitées (figure 6e, f), indiquant que l'inflammasome n'a pas d'impact dans nos modèles de tumeurs.

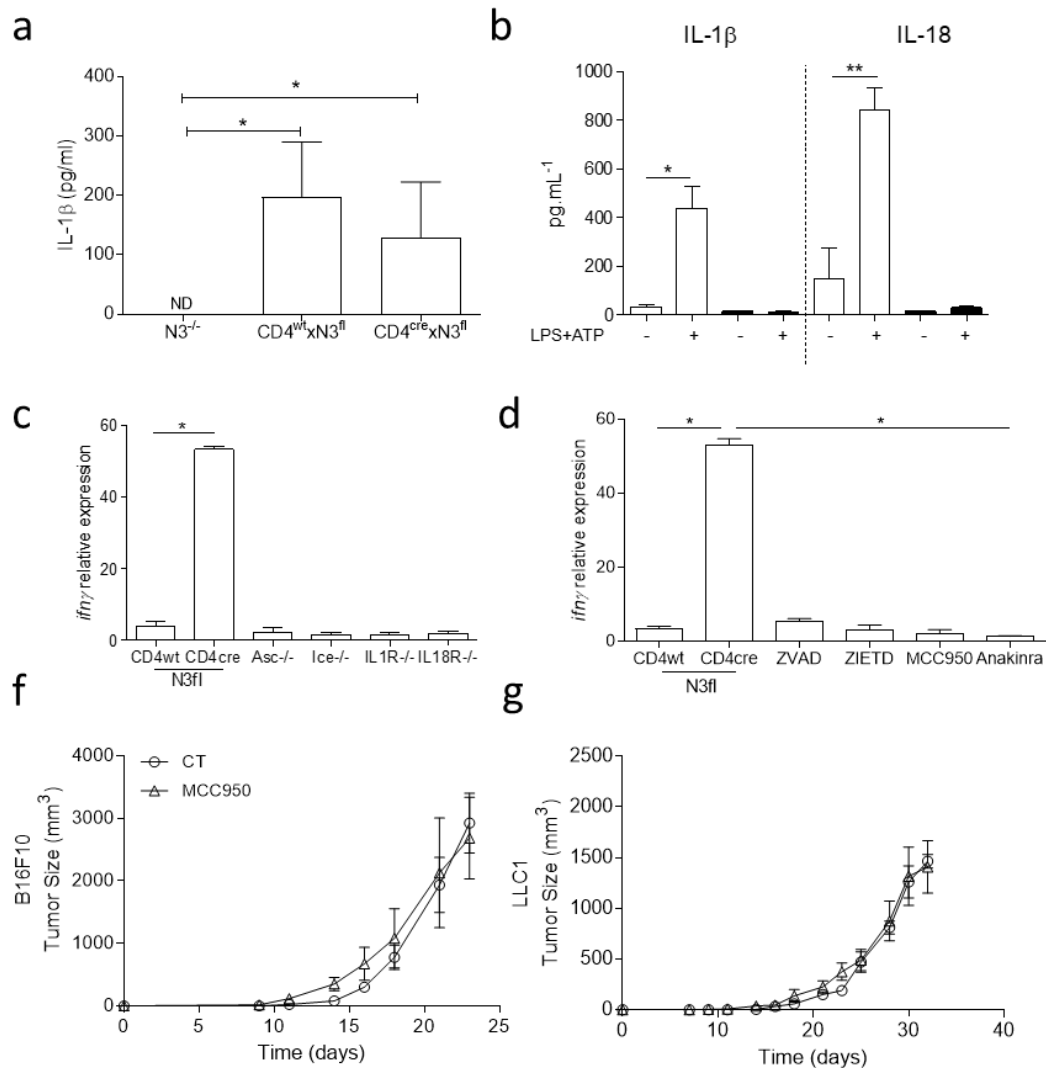


Figure 6 : L'inflammasome NLRP3 n'est pas impliqué dans les effets observés chez les lymphocytes T CD4 *Nlrp3*^{-/-}. Dosage par ELISA de l'IL-1 β produite dans les tumeurs B16F10 implantées dans des souris *Nlrp3*^{-/-}, *CD4 Nlrp3*^{-/-}, ou sauvages (WT) (a). Dosage par ELISA de l'IL-1 β et de l'IL-18 dans le surnageant de macrophages (blanc) ou de Th17 (noir) traités par du LPS et de l'ATP durant 1 jour (b). Analyse de l'expression de *Ifn* γ par rapport au gène *Actb*, de Th17 différenciés à partir de CD4 naïfs sauvages ou issus de souris *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, *Ice*^{-/-}, *Il1ra*^{-/-} et *Il18r*^{-/-} (c) ou traités par des inhibiteurs de l'inflammasome (MCC950), des caspases 1 (ZVAD) et 8 (ZIETD) ou du récepteur à l'IL-1 β (Anakinra) (d). Croissance tumorale de tumeurs B16F10 (e) et LLC1 (f) dans des souris traitées ou non par un inhibiteur de l'inflammasome (MCC950). Les tests statistiques réalisés sont des tests de Mann-Whitney * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$, $n = 3$).

Lors de l'analyse de l'infiltrat, les T CD4 issus de tumeurs B16F10 (TIL) et isolés des ganglions lymphatiques expriment plus d'IFN- γ en ARNm (figure 7a) et en protéine (figure 7b), lorsqu'ils sont *CD4 Nlrp3*^{-/-} par rapport aux contrôles. Parmi les T CD4 infiltrant les tumeurs B16F10, nous avons observé que les Th17 (caractérisés par l'expression de CCR6, ROR γ t et l'absence de FoxP3) produisent plus d'IFN- γ en ARNm (figure 7c) et en protéine (figure 7d) dans les *CD4 Nlrp3*^{-/-} par rapport à leurs contrôles.

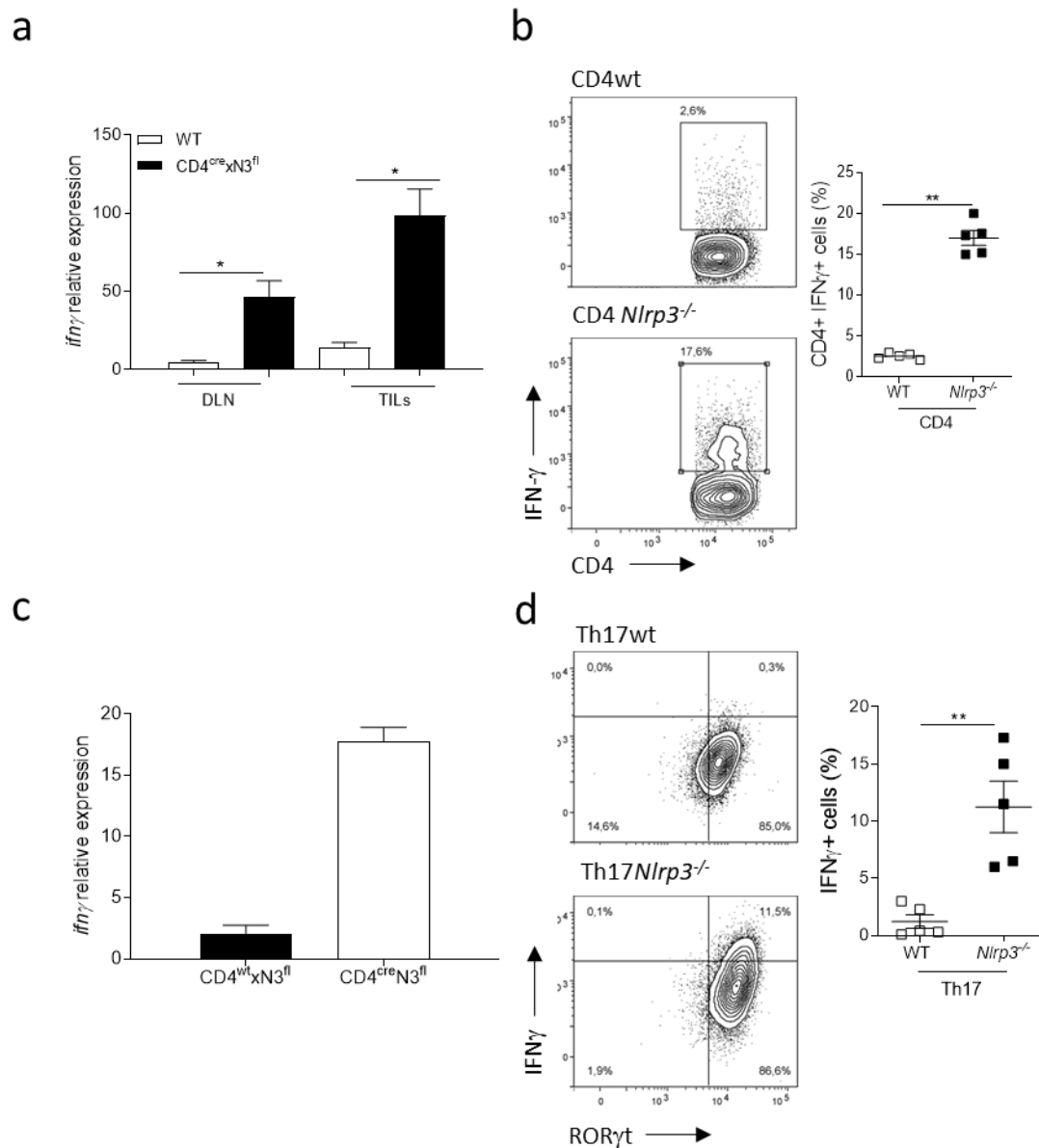


Figure 7 : Analyse de l'expression de l'IFN- γ de T CD4 sauvages ou *Nlrp3*^{-/-} infiltrant des tumeurs B16F10. Analyse de l'expression par RT-qPCR de *Ifn γ* par rapport au gène *Actb* de T CD4 WT ou *Nlrp3*^{-/-} isolés de ganglions drainants (DLN) et de tumeurs (TILs) (a) ou par cytométrie en flux (b). Analyse de l'expression par RT-qPCR de *Ifn γ* par rapport au gène *Actb* de Th17 WT ou *Nlrp3*^{-/-} triés de tumeurs (TILs) (c) ou par cytométrie en flux (d). Les tests statistiques réalisés sont des tests de Mann-Whitney *p<0.05 et **p<0.01, n=5.

En utilisant de la digoxine, précédemment décrite comme bloquant l'activité de ROR γ t, déplaçant ainsi les Th17, nous avons observé que les croissances tumorales des tumeurs B16F10 et LLC1 (figure 8a et b) sont réduites par rapport aux souris contrôles, d'une manière équivalente aux souris CD4 *Nlrp3*^{-/-}. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de souris dépourvues de ROR γ t (figure 8c et d). De plus, la digoxine a complètement abrogé l'effet antitumoral des CD4 *Nlrp3*^{-/-}, suggérant que cet effet est dépendant des Th17 (figure 8e). Ensemble, ces résultats indiquent que l'absence de NLRP3 pourrait affecter l'activité du Th17 dans le cancer et réduire les croissances de tumeurs par le biais d'un effet indépendant de l'inflammasome NLRP3.

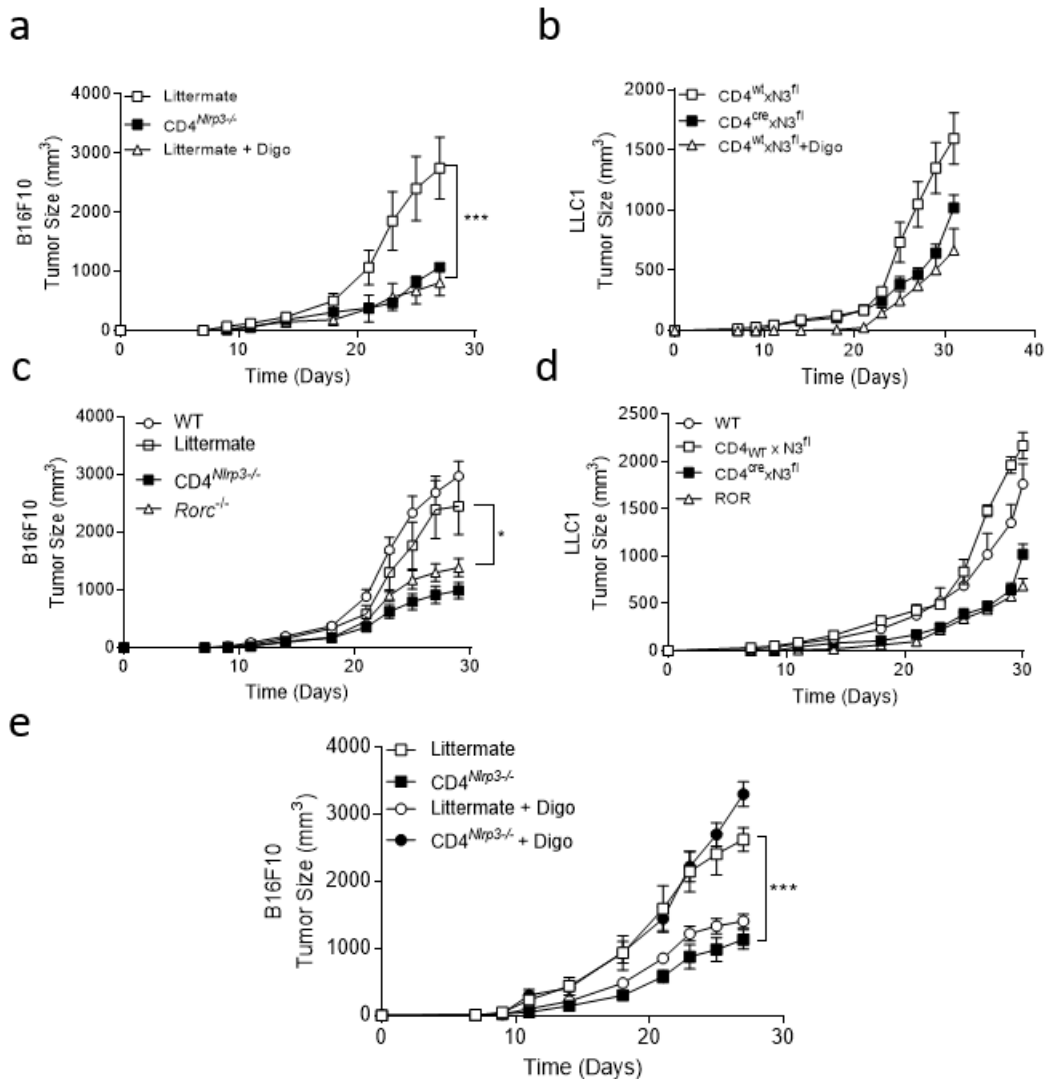


Figure 8 : Impact des Th17 sur la croissance tumorale de cellules B16F10 ou LLC1. Suivi de la croissance tumorale de cellules B16F10 (n=5) chez des souris CD4 WT traitées ou non par de la digoxine (Digo) et CD4 *Nlrp3*^{-/-} (a). Suivi de la croissance tumorale de cellules LLC1 (n=5) chez des souris CD4 WT et CD4 NLRP3^{-/-}, traitées ou non par de la digoxine (Digo) (b). Suivi de la croissance tumorale de cellules B16F10 (c) ou LLC1 (d) chez des souris WT, *Rorc*^{-/-} ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} et leurs contrôles (WT). Suivi de la croissance tumorale de cellules B16F10 (n=5) chez des souris CD4 WT et CD4 NLRP3^{-/-}, traitées ou non par de la digoxine (Digo) (e). Les résultats représentent 3 expériences *in vivo* indépendantes. La significativité a été établie par des tests de 2-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey *p<0.05 et ***p<0.005, n= 5 souris par groupe.

2. L'absence de NLRP3 favorise un profil inflammatoire des Th17.

Nos résultats ont montré que sans NLRP3, les Th17 produisent un haut niveau d'IFN- γ . Afin de caractériser le profil moléculaire des Th17 selon le statut de *Nlrp3*, nous avons mesuré le profil d'expression des ARNm par RNAseq de Th17 différenciés *in vitro*. Nous avons comparé le profil d'expression des gènes des Th17 sauvages ou *Nlrp3*^{-/-} différenciés *ex vivo* soit avec du TGF- β et de l'IL-6 afin de générer un profil régulateur, soit avec de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-23 (sans TGF- β) afin de générer des Th17 inflammatoires. Nous avons généré des T régulateurs et des Th1 comme contrôles respectifs. Nos résultats ont montré que les Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} ont

un profil transcriptionnel très différent comparé aux Th17 sauvages. L'absence de NLRP3 a généré un différentiel dans 759 gènes ($FDR \leq 0.05$) comparativement aux Th17 sauvages. Parmi eux, 463 gènes sont surexprimés, et 296 sous-exprimés, indiquant que NLRP3 a un effet promoteur mais aussi répresseur dans le programme transcriptionnel des Th17. Un clustering par la méthode « Unsupervised hierarchical » et une analyse par PCA ont révélé que les Th17 *Nlrp3*^{-/-} possèdent un profil transcriptionnel proche des Th17 inflammatoires (figure 9a et b). En se basant sur la littérature, nous nous sommes concentrés sur 31 gènes caractéristiques des Th17 inflammatoires. Au sein de ces 31 gènes, 17 étaient surexprimés dans les Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} après 72h de différenciation *in vitro*, représenté en volcano plot (figure 9c).

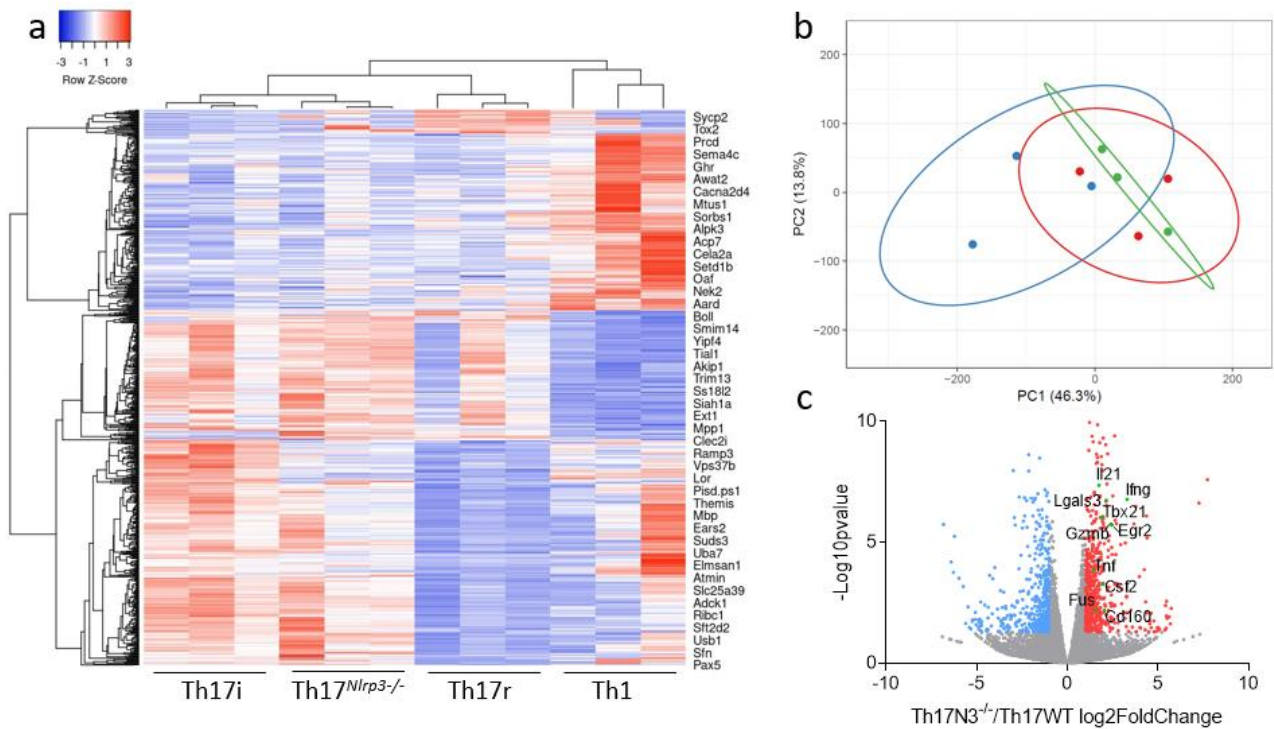


Figure 9 : L'absence de NLRP3 favorise un profil inflammatoire des Th17. Heatmap représentant la hiérarchie de cluster de données de RNAseq de : Th1 WT, Th17 inflammatoire (Th17i) WT, Th17 régulateurs (Th17r) WT ou *Nlrp3*^{-/-} différenciés *in vitro* pendant 72h (a). Analyse par composante principale (PCA) des mêmes données présentées en a, où les Th17r WT sont représentés en bleu, les Th17i WT, en rouge et les Th17r *Nlrp3*^{-/-}, en vert (b). Volcano plot de la distribution différentiellement exprimée des gènes provenant des données présentées en (a). Les gènes surexprimés chez les Th17r *Nlrp3*^{-/-} sont représentés en rouge, les gènes sous-exprimés sont représentés en bleu et les gènes signatures inflammatoires sont représentés en vert, n=3.

En réalisant une cinétique d'expression par RNAseq, nous avons observé que le profil inflammatoire des Th17 augmente avec le temps chez les Th17 *Nlrp3*^{-/-} après 24 et 72h de différenciation (figure 10a et b). Pour confirmer ces données, nous avons analysé l'expression de ces gènes par RT-qPCR chez les Th17 sauvages ou *Nlrp3*^{-/-} durant une cinétique de 24h, 72h et 7 jours. Les résultats ont confirmé que les Th17 *Nlrp3*^{-/-} acquièrent un profil inflammatoire stable au cours du temps (figure 10c).

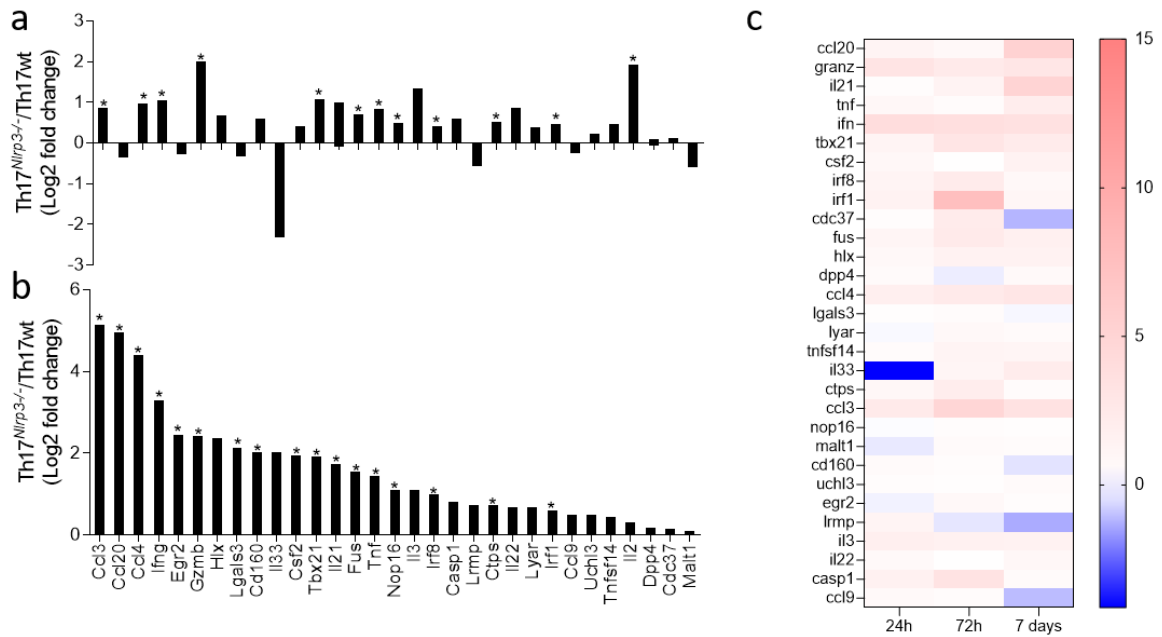


Figure 10 : Cinétique d’expression des gènes différentiellement exprimés entre les Th17 WT et CD4 *Nlrp3*^{-/-}. Expression différentielle des gènes de la signature inflammatoire des Th17r *Nlrp3*^{-/-} par RNAseq après 24h (a) ou 72h (b) de différenciation *in vitro*, par rapport à des T CD4 naïfs WT. Heat map représentant l’expression différentielle du profil inflammatoire des Th17r, évaluée par RT-qPCR durant une cinétique de différenciation *in vitro* durant 24h, 72h ou 7 jours, par rapport à des T CD4 naïfs WT. La significativité a été établie par des tests de 1-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey *p<0.05, n= 3 souris par groupe

Enfin, nous avons validé au niveau protéique l’expression des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ , TNF- α , GM-CSF (codé par le gène *Csf2*) et de la protéase à serine Granzyme B dans les Th17 *Nlrp3*^{-/-} différenciés *in vitro* (figure 11a). Nous avons confirmé nos résultats *in vivo* dans des tumeurs B16F10. Nous avons isolé des lymphocytes T CD4 infiltrant et exprimant CCR6 mais pas FoxP3. Il s’agit d’une population enrichie en Th17, dont nous avons analysé le profil inflammatoire en étudiant par RT-qPCR les 15 gènes les plus pertinents précédemment identifiés. Nous avons confirmé *in vivo* que le profil inflammatoire des cellules CCR6⁺ FoxP3⁻ est aussi augmenté chez les souris porteuses de tumeur CD4 *Nlrp3*^{-/-}, par rapport à leurs contrôles (figure 11b).

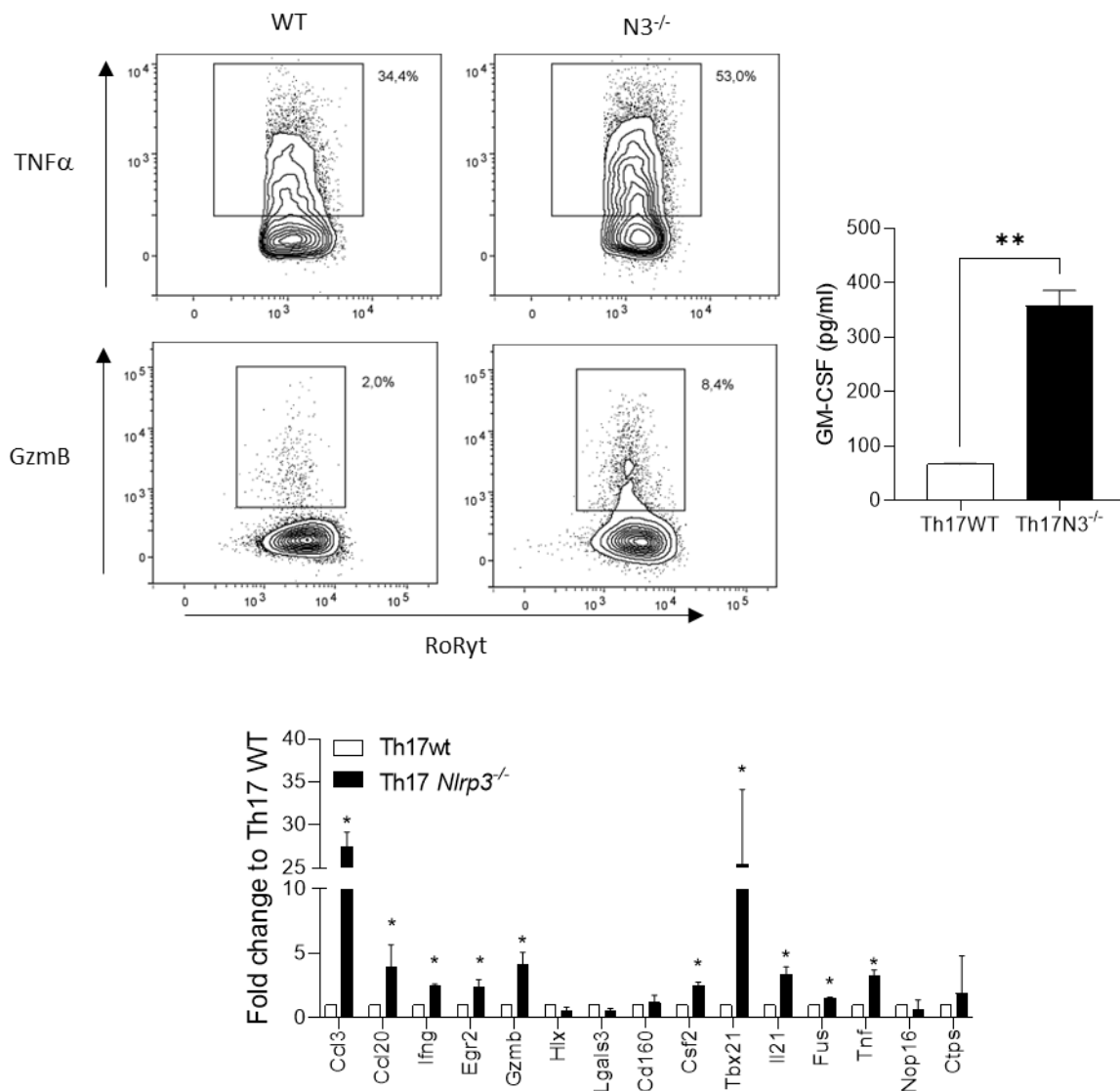


Figure 11 : Les Th17r *Nlrp3*^{-/-} ont un profil plus inflammatoire que les Th17r WT. Détection du TNF- α et du granzyme B par cytométrie en flux (gauche) et dosage de GM-CSF par ELISA dans le surnageant de culture de Th17r WT ou *Nlrp3*^{-/-} différenciés *in vitro* durant trois jours (droite) (a). Expression des gènes signatures inflammatoires par rapport au gène *Actb* évaluée par RT-qPCR de Th17 (CD4, CCR6⁺ Foxp3⁻) isolés de tumeurs B16F10 portées par des souris WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-}. La significativité a été établie par des tests de 2-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$, $n = 3$ souris par groupe.

Notre équipe a montré précédemment que les Th17 immunosuppresseurs infiltrant les tumeurs sont caractérisés par l'expression des enzymes membranaires CD39 et CD73, qui sont deux ectonucléotidases immunosuppressives convertissant l'ATP en AMP puis en adénosine. Afin de déterminer si l'absence de NLRP3 affecte les ectonucléotidases, nous avons analysé leur expression par RT-qPCR et par cytométrie en flux. Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence d'expression des gènes *Entpd1* et *Nt5e*, codant respectivement pour CD39 et CD73 (figure 12a et b), ni à la membrane des cellules (figure 12c). De plus, il n'y a aucune différence dans la consommation d'ATP (figure 12d) par ces cellules, ni dans la production d'AMP (figure 12e). Les Th17 inflammatoires sont aussi caractérisés par une activité glycolytique accrue. De fait, nous avons étudié l'activité glycolytique des Th17 déficients pour

Nlrp3 et l'avons comparé à celle des Th17 sauvages et inflammatoires. Nos résultats ne montrent aucun changement d'activité métabolique des Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 12f-h).

Ensemble, ces données montrent que l'absence de *Nlrp3* induit un basculement partiel entre le phénotype immunosuppresseur et inflammatoire des Th17.

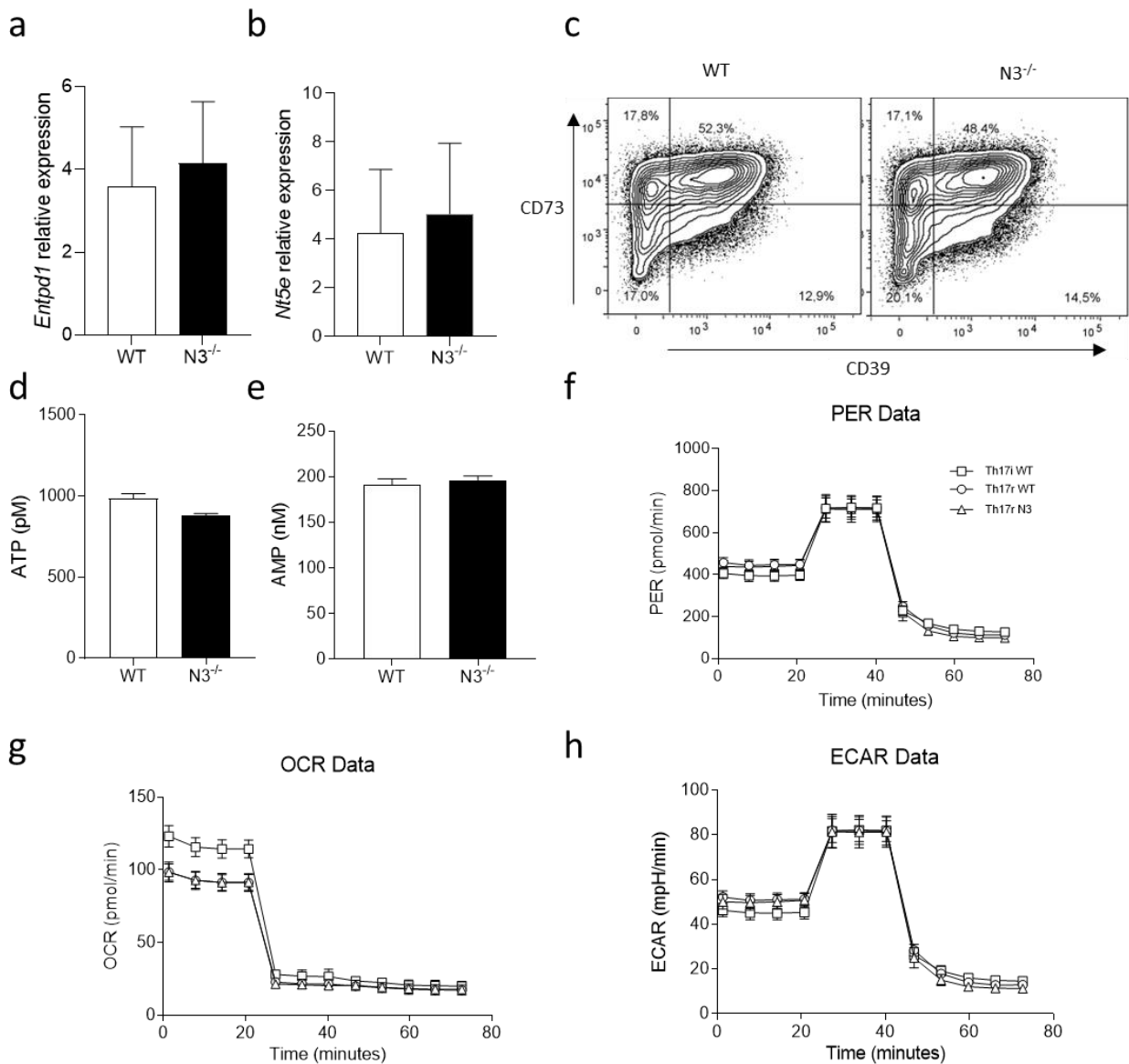


Figure 12 : NLRP3 n'affecte pas le métabolisme des Th17. Les Th17 sont différenciés *in vitro* durant trois jours et proviennent soit de souris WT soit de souris CD4 *Nlrp3*^{-/-}. Expression relative des ARNm de *Entpd1* (a) ou *Nt5e* (b) par rapport au gène *Actb*. Expression de CD39 et CD73 par cytométrie en flux (c). Quantité d'ATP (d) ou d'AMP (e) dosée dans le surnageant de culture de Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-}, différenciés pendant 3 jours *in vitro*. Les taux d'efflux de protons (PER) (f), taux de consommation d'oxygène (OCR) (g) et taux d'acidification du milieu extracellulaire (ECAR) (h) sont mesurés dans le temps avec addition de rotenone et d'antimycine A (Rot/AA) à 25min et addition de 2-deoxy-D-glucose (2-DG) à 45min en utilisant le kit Agilent Seahorse. La significativité statistique a été évaluée par test de Mann-Whitney (a-e) et one-way ANOVA (f-h), n=3.

3. Les Th17 déficients pour NLRP3 perdent leurs fonctions immunosuppressives

Les Th17 différenciés à partir de souris OTII sauvages ou *Nlrp3*^{-/-} (possédant un TCR spécifique de l'ovalbumine) ne sont pas cytotoxiques envers les cellules B16-OVA (exprimant l'ovalbumine à leur surface) lorsqu'elles sont co-cultivées ensemble (figure 13a). Ensuite, nous avons testé si les Th17 pouvaient affecter indirectement la croissance tumorale en activant d'autres cellules immunitaires. En utilisant des anticorps déplétant les NK (mAb) ou des liposomes au clodronate pour éliminer les macrophages, nous avons montré que ni les NK ni les macrophages ne semblent avoir de rôle majeur dans la croissance tumorale des souris CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 13b et c). En revanche, les anticorps bloquant anti-CD8 ont complètement aboli le ralentissement de la croissance tumorale observée dans les souris CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 13d). L'analyse des cellules immunitaires a montré qu'il y avait plus de T CD8 dans les TIL des souris CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 13e). Ces cellules produisent aussi plus d'IFN- γ et de granzyme B (figure 13f et g) et prolifèrent plus (figure 13h) que leurs contrôles. Le niveau d'expression des points de contrôle immunitaires n'est pas affecté par le statut de *Nlrp3* (non-montré).

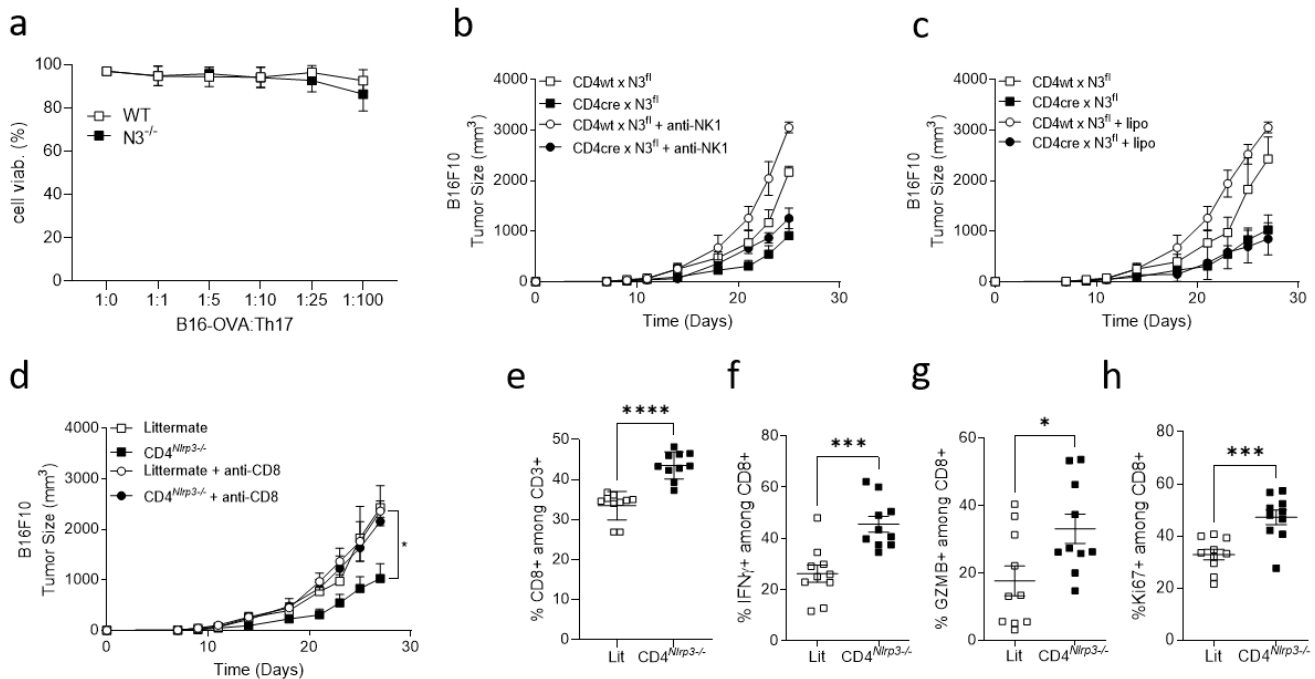


Figure 13 : Impact de la déficience de NLRP3 sur la biologie des lymphocytes Th17. Analyse par cytométrie en flux de la viabilité de cellules B16-OVA co-cultivées *in vitro* pendant 24h avec des Th17 OT-II WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} (a). Croissance tumorale de cellules B16F10 injectées en sous-cutanée chez des souris WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-}, déplétées pour les NK par un anti-corps anti-NK1 (b) ou pour les macrophages par des liposomes contenant du clodronate (c). Croissance tumorale de cellules B16F10 injectées en sous-cutané chez des souris WT (Lit) ou CD4 *Nlrp3*^{-/-}, traitées ou non par anticorps bloquants anti-CD8a (d). Analyse par cytométrie en flux de la proportion de T CD8 infiltrant (e), leur production d'IFN- γ (f) de granzyme b (g) et leur prolifération par marquage au Ki67 (h). La significativité a été évaluée par des tests statistiques de 2-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey ainsi que par des tests de Mann-Withney, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$, $n = 3$.

Les cellules Th17 ont été décrites comme étant immunosuppressives. Nous avons évalué *in vitro* l'activité immunosuppressive des Th17 sur les T CD8. Les T CD8 isolés de souris OTI (possédant un TCR spécifique de l'ovalbumine) ont été stimulés *in vitro* par le peptide SIINFEKEL et cultivés en présence de Th17 différenciés à partir de CD4 naïfs OTII sauvages ou *Nlrp3*^{-/-}. Les Th17 OTII WT diminuent la production d'IFN- γ , de granzyme B et de TNF- α des T CD8, tandis que les Th17 CD4 OTII *Nlrp3*^{-/-} n'inhibent ni la production d'IFN- γ (figure 14a), de granzyme B (figure 14b) ou de TNF- α (figure 14c) par les T CD8, ni leur prolifération (figure 14d). Nous avons isolé des T CD8 infiltrants de souris sauvages ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} porteuses de tumeurs B16F10, afin de les cultiver *in vitro* en présence de ces mêmes cellules tumorales pendant 24h. Nous avons observé que les T CD8 provenant de souris CD4 *Nlrp3*^{-/-} étaient plus cytotoxiques comparés aux T CD8 issus des souris contrôles (figure 14e). Ensemble, ces résultats montrent que les Th17 sont capables de limiter l'activité antitumorale des T CD8 d'une manière dépendante de NLRP3.

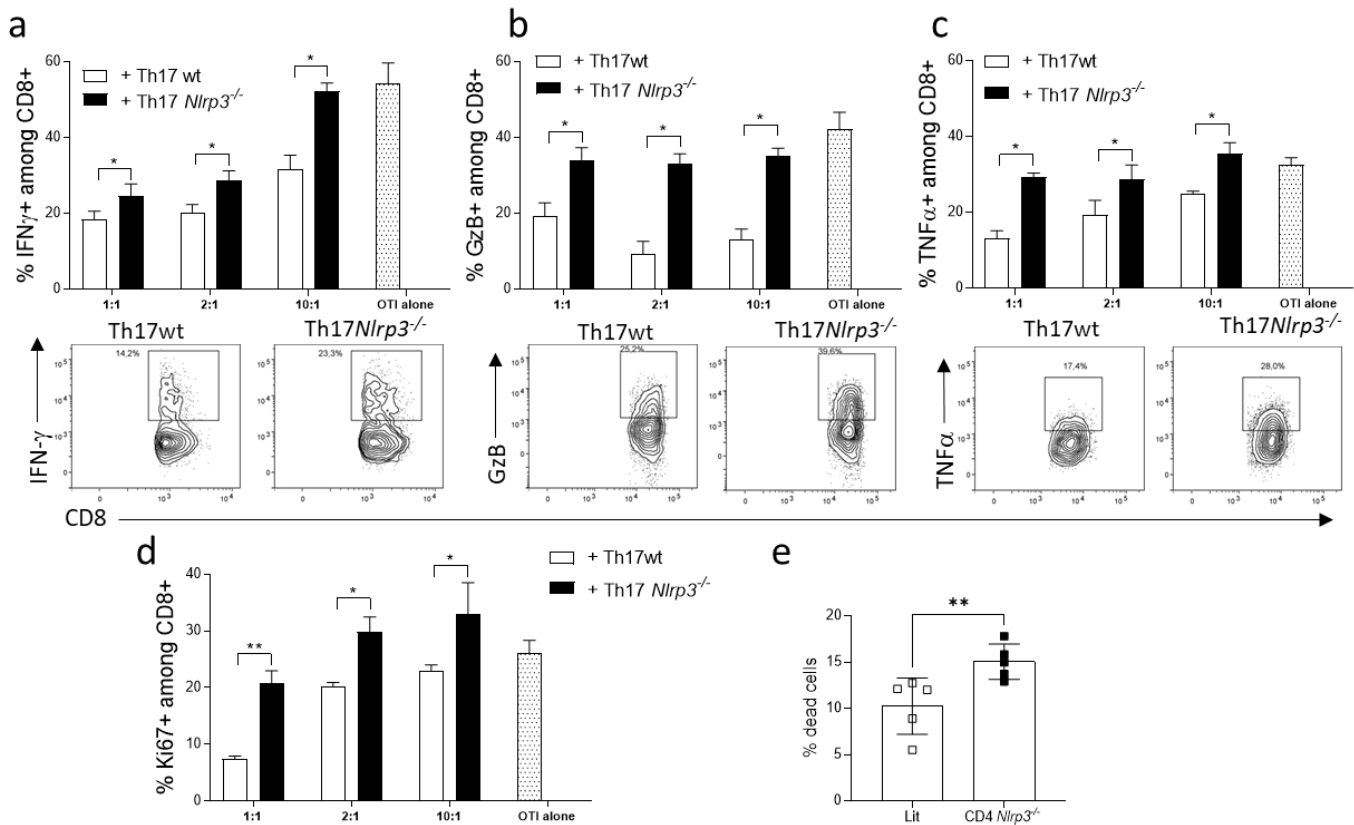


Figure 14 : Les Th17 déficients pour NLRP3 ont un potentiel immunosuppresseur diminué. Les lymphocytes T CD4 ont été isolés à partir de souris CD4 *Nlrp3*^{-/-} ou leurs contrôles, puis différenciés en Th17 régulateurs pendant 3 jours. Les T CD8 ont été isolés de souris OT I puis cultivés seuls ou en présence de Th17 (selon les ratios CD8 : Th17, 1:1, 2:1, 10:1). Les productions d'IFN- γ (a) de granzyme B (b) de TNF- α (c) et la prolifération (d) ont été évaluées par cytométrie en flux. Les T CD8 infiltrant de tumeurs B16F10 chez des souris WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} ont été isolés puis co-cultivés avec des cellules B16F10 *in vitro*, pendant 24h. La mortalité des cellules B16F10 a été évaluée par cytométrie en flux, sur les cellules négatives pour CD45 (e). La significativité a été évaluée par des tests statistiques de Mann-Whitney *p<0.05, **p<0.01, n=3.

4. NLRP3 possède un rôle indépendant de l'inflammasome dans les cellules Th17

L'inflammasome NLRP3 est connu pour participer à la différenciation des T CD4. Nous avons précédemment démontré que l'inflammasome n'est pas impliqué dans nos conditions expérimentales. L'*Ifng* peut être régulé par le facteur de transcription T-bet (codé par le gène *Tbx21*), IRF1 ou Eomes. Nous avons donc étudié durant une cinétique leur expression dans les Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 15a-c). Surprenamment, l'augmentation d'expression de l'*Ifng* précède l'expression de T-bet, IRF1 ou Eomes dans les Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-}, suggérant que ces facteurs de transcription ne sont pas impliqués dans la régulation de l'*Ifng* observée ici (figure 15d). L'expression de l'*Ifng* peut aussi être induite par la voie de signalisation STAT1, cependant la phosphorylation de STAT1 (marque d'activation du facteur de transcription) est identique dans les Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 15e et f).

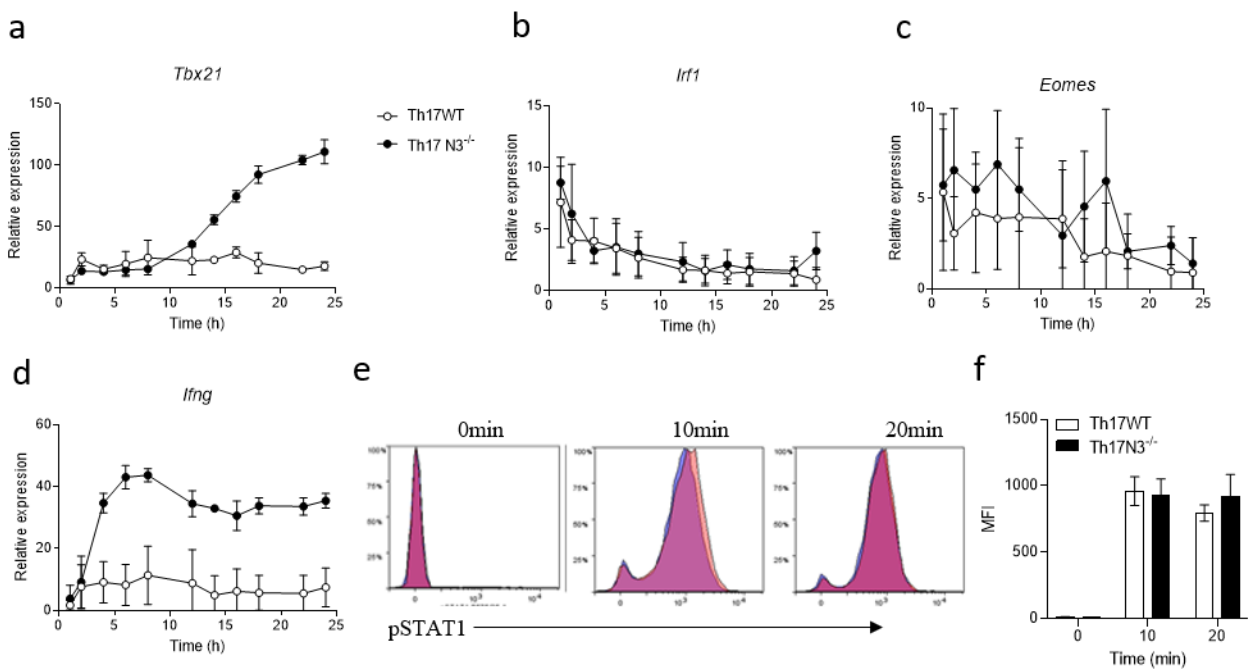


Figure 15 : Rôle de NLRP3 sur la biologie des lymphocytes Th17. Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes *Tbx21* (a), *Irf1* (b), *Eomes* (c) et *Ifng* (d) normalisée par rapport à l'expression du gène *Actb* chez des T CD4 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} naïfs, différenciés en Th17 au cours du temps. Evaluation par cytométrie en flux du niveau de phosphorylation de STAT1 chez des T CD4 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} naïfs, différenciés en Th17 au cours du temps. La significativité statistique a été évaluée par des tests 1-way ANOVA, n=3.

L'IL-6 et le TGF- β interviennent dans la différenciation des Th17. Le TGF- β peut inhiber les fonctions effectrices des cellules immunitaires et ainsi limiter la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ . Afin de déterminer si la « voie de signalisation NLRP3 » est reliée à celle du TGF- β , nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques permettant de bloquer plusieurs voies de signalisation découlant du récepteur au TGF- β . Nos expériences soulignent que l'inhibiteur de SMAD3 utilisé pendant la différenciation des Th17 induit l'expression de l'*Ifng* dans les cellules Th17 WT, mais n'a eu aucun effet chez les Th17 CD4

Nlrp3^{-/-} (figure 16a). L'activation du récepteur au TGF- β durant la différenciation des Th17 induit la phosphorylation de SMAD3 chez les Th17 WT, mais pas chez les Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 16b). Le niveau total d'expression de SMAD3 est quant à lui identique (figure 16c). Par expérience de ligation par proximité (PLA), nous n'avons montré aucune proximité entre NLRP3 et pSMAD3. Cependant, nous avons observé un signal indiquant une forte proximité entre NLRP3 et la sous-unité 1 du récepteur au TGF- β (figure 16d).

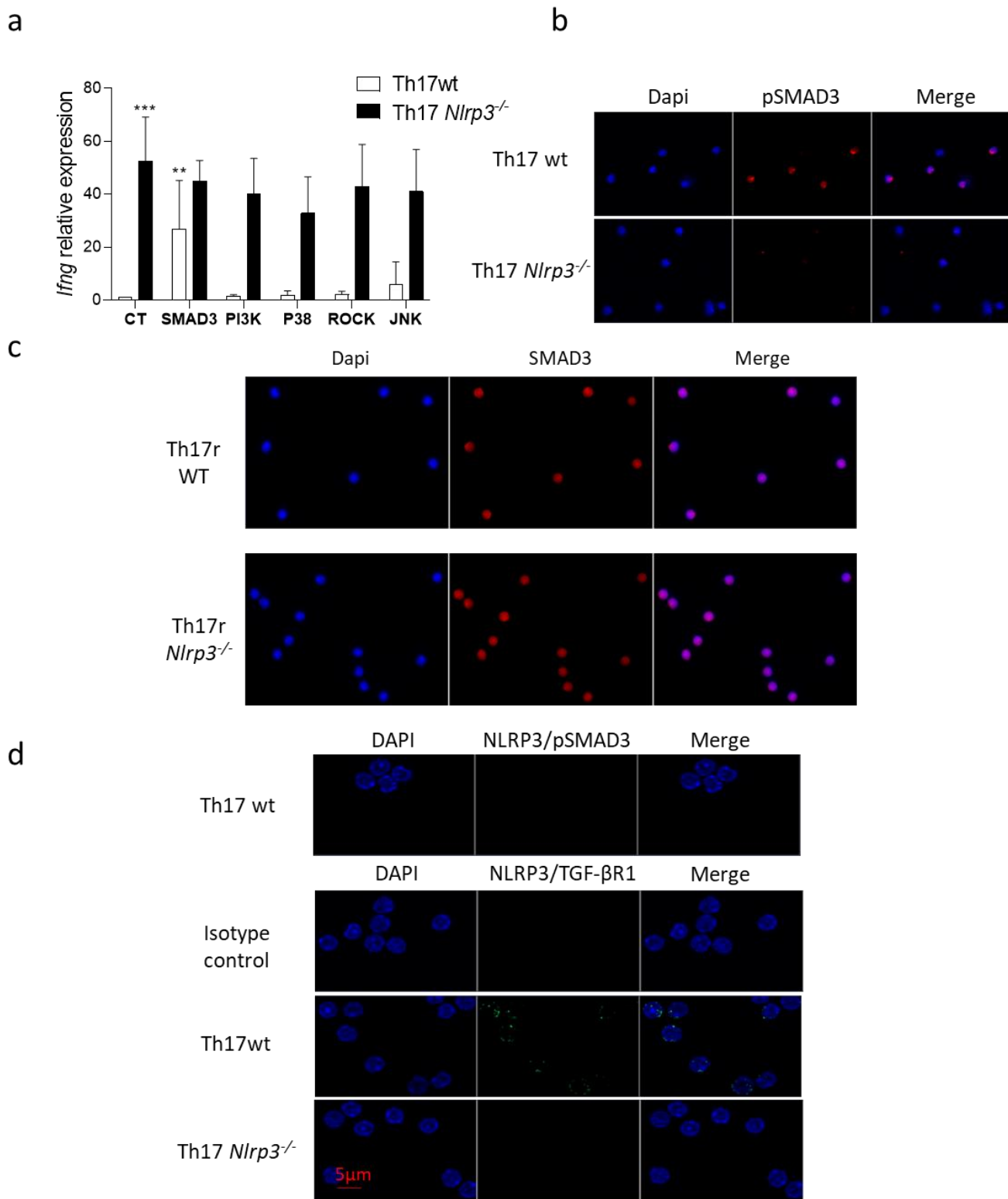


Figure 16 : NLRP3 possède des fonctions indépendantes de l'inflammasome dans les Th17. Analyse par RT-qPCR de l'expression du gène *Ifng* de T CD4 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} naïfs, différenciés *in vitro* pendant 24h en Th17, traités ou non (CT) par des inhibiteurs pharmacologiques de SMAD3 (SIS3), PI3K (LY294002), P38 (SB203580), ROCK (Y27632) ou JNK (JNK Inhibitor II) (a). Marquage par immunofluorescence de pSMAD3 dans des cellules Th17 différenciées à partir de T CD4 naïfs WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} durant une heure (b). Fluorescence totale de SMAD3 détectée par microscopie chez des Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-}(c). Expérience de ligation par proximité de NLRP3 et pSMAD3 (en haut) et de NLRP3 et de la sous-unité 1 du récepteur au TGF- β (bas) (d). La forte proximité des protéines est représentée par un signal vert. La significativité statistique a été évaluée par des tests de Mann-Whitney entre le contrôle et les conditions traitées, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 3$.

Pour valider que SMAD3 est responsable de l'inhibition de la transcription de l'*Ifng*, nous avons analysé son promoteur avec MatInspector et identifié un site de fixation putatif de pSMAD3 entre -551 et -561bps. Les expériences de ChIP sur pSMAD3 dans les Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} nous ont permises d'observer un enrichissement du promoteur dans les Th17 WT, contrairement aux Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 17a). Nous avons montré précédemment que le granzyme B, le TNF- α et le GM-CSF sont induits dans les Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-}. Nous avons analysé leur promoteur avec MatInspector et identifié des sites de fixation putatifs de pSMAD3 de -782 à -789 bps pour le gène *Csf2* et de -313 à -323 bps pour le gène *Tnfa*, mais aucun site de fixation pour le promoteur du gène *Gzmb*. Les expériences de ChIP pour comparer la fixation de pSMAD3 dans les Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} ont montré un enrichissement pour le promoteur du gène *Csf2* (figure 17b), mais pas celui du gène *Tnfa* (figure 17c). Le granzyme B, le TNF- α et le GM-CSF peuvent aussi être induits par l'IFN- γ . Nous avons testé l'effet d'un anticorps bloquant l'IFN- γ durant la différenciation des Th17. De fait, nous avons montré que l'IFN- γ régule uniquement l'expression du gène *Gzmb*, mais pas du gène *Tnfa* ni du gène *Csf2* (17d-f).

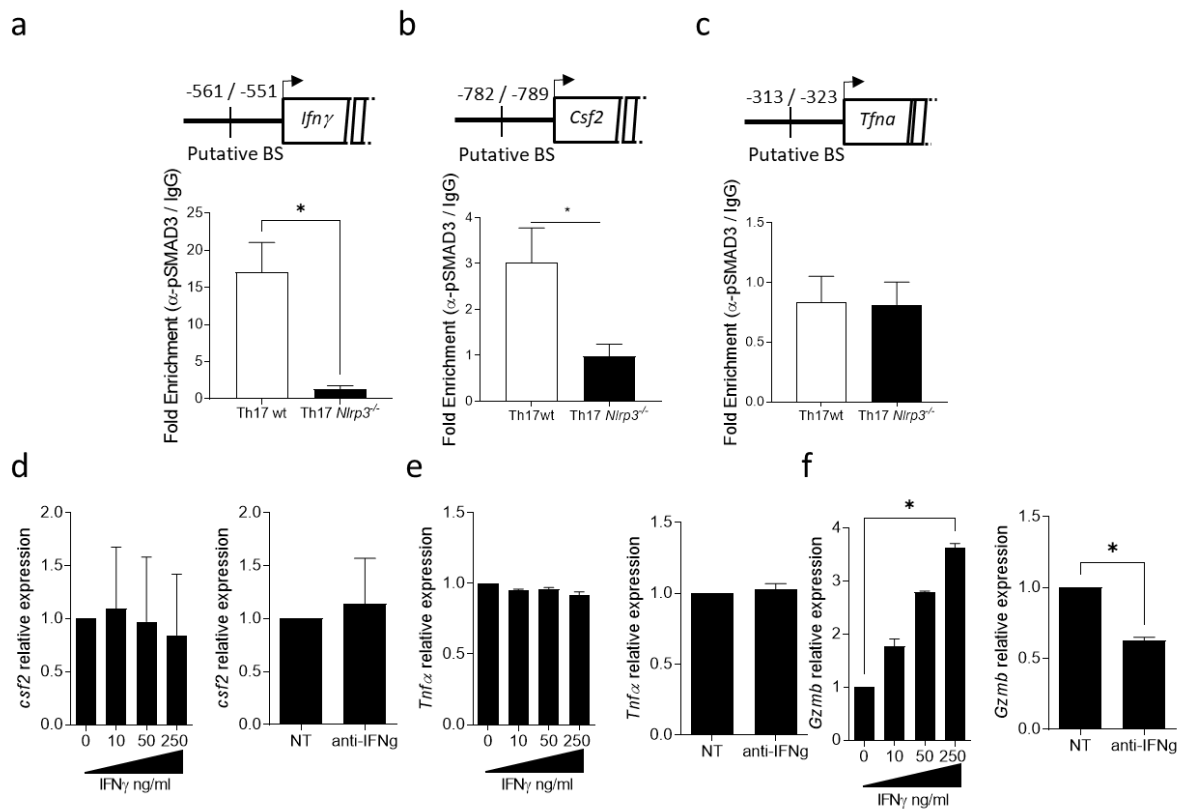


Figure 17 : Impact de NLRP3 sur la plasticité des Th17. Analyse de l'enrichissement des sites de fixation putatif de pSMAD3 sur les promoteurs des gènes *Ifng* (a), *Csf2* (b) et *Tnfa* (c) par expérience de ChIP chez des Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} différenciés pendant une heure. Analyse de l'expression par RT-qPCR des gènes *Csf2* (d), *Tnfa* (e) et *Gzmb* (f) de Th17 cultivés pendant 72h *in vitro* et traités par une concentration croissante d'IFN- γ (gauche) ou par anticorps bloquant anti-IFN- γ (droite). L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène *Actb* et la significativité statistique a été évaluée par les tests de Mann-Whitney (a-c) et par one-way ANOVA (d-f), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, n=3.

L'ensemble de ces données montrent que NLRP3 participe à la différenciation des Th17 en régulant la voie de signalisation du TGF- β à travers SMAD3, qui inhibe l'expression de l'*Ifng* et de *Csf2*.

5. L'absence de NLRP3 inhibe la transdifférenciation des Th17 en Treg

Comme attendu, l'analyse des CD4 TIL dans les tumeurs B16F10 (figure 18a) et LLC1 (figure 18b) a montré une fréquence plus faible de Th2, mais surprenamment, il y avait aussi moins de Treg dans les souris CD4 *Nlrp3*^{-/-}, comparé aux souris contrôles. Ces résultats sont contradictoires avec les expériences conduites *in vitro*, montrant que l'absence de NLRP3 n'affecte pas la différenciation des Treg (figure 18c). Nous avons formulé l'hypothèse que NLRP3 pouvait affecter la capacité des Th17 à se transdifférencier en Treg. Nous avons isolé puis différencié *in vitro* des T CD4 naïfs issus de souris WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-}, en présence de TGF- β et d'IL-6. Une sous-population de cellules Th17 WT exprimant ROR γ t exprimait aussi FoxP3 après 3 jours, contrairement aux Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 18d). De plus, la proportion de cellules exprimant FoxP3 durant la différenciation *in vitro* de Th17 WT augmente au cours du temps (figure 18e).

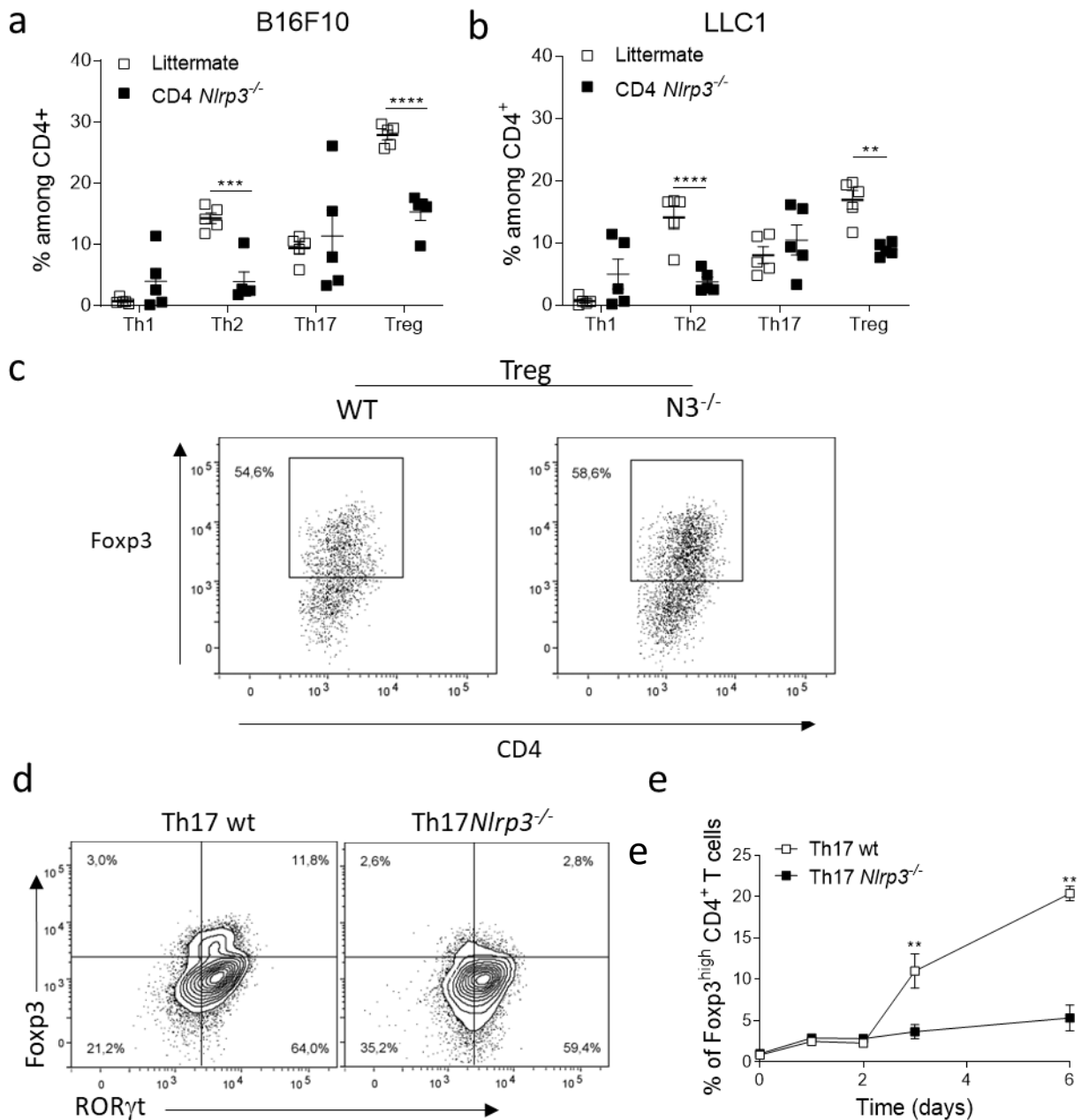


Figure 18 : Impact de NLRP3 dans la différenciation des Th17. Proportion des sous-types de T CD4 (Th1, Th2, Th17, Treg) dans des tumeurs sous-cutanées de cellules B16F10 (a) et LLC1 (b) injectées dans des souris CD4 *Nlrp3*^{-/-} et leurs contrôles. Analyse de la proportion de cellules FoxP3 par cytométrie en flux de Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} après 72h de différenciation *in vitro* (c). Analyse de la proportion de cellules FoxP3 et RORyt par cytométrie en flux de Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} pendant 0,1,2,3 (d et e) et 6 jours (e) de différenciation *in vitro*. La significativité statistique a été évaluée par le test de Mann-Withney, **p<0.01, *** p<0.005, **** p<0.001, n=3.

Afin de confirmer si cette différence existe *in vivo*, nous avons différencié des T CD4 naïfs à partir de souris CD45.2 OTII ou CD45.2 OTII *Nlrp3*^{-/-} en Th17. Ensuite, nous avons transféré ces cellules dans des souris congéniques WT pour NLRP3, mais exprimant l'allèle CD45.1, 7 jours après l'injection par intraveineuse de cellules B16OVA. Après 48h, nous avons analysé l'infiltrat en T CD4 des poumons et observé plus de cellules FoxP3 positives parmi les T CD4 dans les poumons de souris transférées avec des cellules Th17 NLRP3 WT CD45.2, par rapport aux souris ayant reçu des Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} CD45.2 (figure 19a). De plus, nous n'avons pas observé de différence entre la fréquence de Th1 ou de Th17 identifiés conformément grâce à leurs marqueurs membranaires (figure 19b). En analysant les TIL, nous avons observé que les cellules CD4 FoxP3 des souris CD45.1 ne sont pas impactées par le transfert adoptif de Th17 (figure 19c). D'autre part, la quantité de cellules FoxP3 parmi les CD45.2 est plus grande dans les souris ayant reçu des Th17 WT que dans celle ayant reçu des Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} par transfert adoptif (figure 19c). De plus, la fréquence des cellules exprimant à la fois FoxP3 et ROR γ t est aussi plus grande parmi les Th17 WT CD45.2 par rapport aux souris Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} CD45.2 (figure 19d). Nous avons obtenu des résultats similaires lors du transfert adoptif de Th17 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} dans des souris CD4 *Rorc*^{-/-}, dépourvues de Th17 (figure 19e). Enfin, nous avons utilisé un anticorps bloquant anti-CD25 afin de cibler les Treg *in vivo* durant une croissance de tumeurs B16F10 dans des souris WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-}. Nous avons observé que l'anticorps réduit drastiquement la croissance tumorale chez les souris WT (figure 19f) tandis qu'il n'affecte que modestement la croissance tumorale des souris CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 19g).

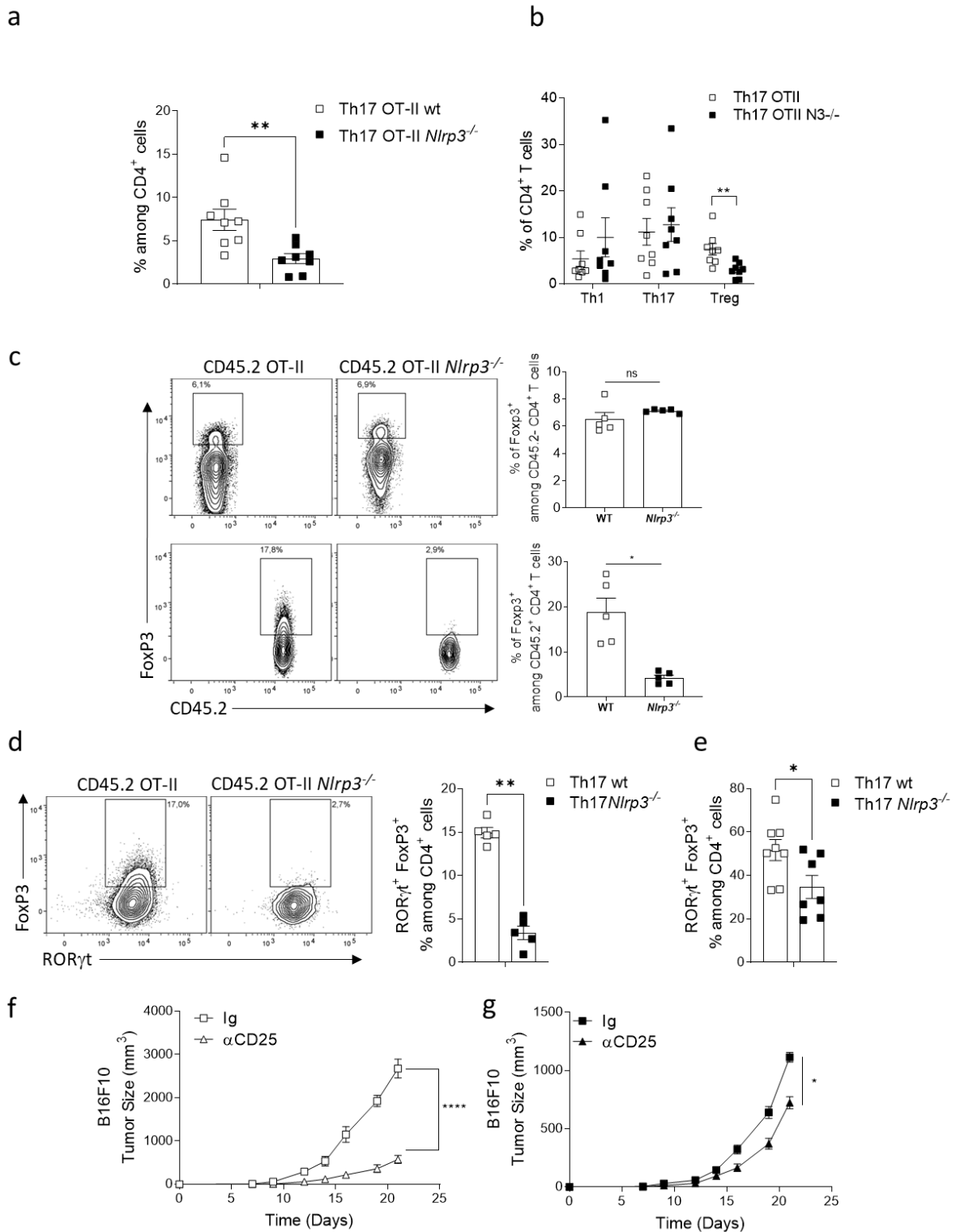


Figure 19 : Impact des fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3 dans la biologie des lymphocytes Th17. Les Th17r ont été différenciés à partir de T CD4 naïfs isolés de souris WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} OT-II CD45.2. Ces Th17 ont ensuite été transférées dans des souris CD45.1 WT (a-d) ou CD4 *RORc*^{-/-} dépourvue de Th17 (e) porteuses de tumeurs pulmonaires B16OVA, dont les cellules ont été injectées. 48h après injection des Th17, la fréquence des Treg (FoxP3⁺) présents dans les poumons a été analysée par cytométrie en flux, parmi les CD4 totaux (a), parmi les cellules CD45.2⁺, les CD45.2⁻ (c) et parmi les cellules RORyt⁺ (d et e). Analyse des sous types de T CD4 infiltrant les poumons de souris CD45.1 injectées avec des cellules B16OVA 48h après transfert adoptif de cellules Th17 OT-II CD45.2 WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} (b). Analyse de la croissance tumorale dans des souris CD4 WT (f) ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} (g) porteuses de tumeurs sous-cutanées B16F10 injectées ou non avec un anticorps bloquant anti-CD25. Les données montrent trois expériences indépendantes. La significativité statistique a été évaluée par les tests 2-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey et par tests de Mann-Withney, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001, n=3.

Ensemble, ces résultats indiquent que NLRP3 est impliqué dans l'expression de FoxP3 des Th17, ce qui pourrait expliquer la diminution du contrôle de la croissance des tumeurs chez les souris WT.

6. Cibler NLRP3 dans les Th17 a un intérêt thérapeutique

Afin d'évaluer si NLRP3 peut être utilisé en tant que cible thérapeutique, nous avons croisé des souris CD4^{cre} ERT2 avec des souris NLRP3^{flox/flox}. Ainsi, la délétion de NLRP3 n'est induite qu'en présence de Tamoxifène. Nous avons traité les souris au moment de l'implantation des tumeurs et montré un ralentissement de la croissance des tumeurs B16F10 (figure 20a). Dans un contexte de thérapie cellulaire, les Th17 régulateurs différenciés à partir de TGF- β et d'IL-6 ont été décrits comme ayant des propriétés pro-tumorales. Grâce à des expériences de transfert adoptif, nous avons montré que le transfert de Th17 OTII CD4 *Nlrp3*^{-/-} dans des souris WT réduit le nombre de foyers tumoraux pulmonaires issus de l'injection intraveineuse de cellules B16-OVA (figure 20b). En analysant les cellules infiltrantes, nous avons observé plus de Treg après un transfert de Th17 WT, par rapport à un transfert de cellules Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 20c). De plus, nous avons observé que les T CD8 produisent plus d'IFN- γ (figure 20d), de Granzyme B (figure 20e) et de TNF- α (figure 20f) après un transfert de Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} par rapport au transfert de Th17 WT. L'injection d'anticorps ciblant les CD8 a complètement annulé l'effet antitumoral du transfert de Th17 OTII CD4 *Nlrp3*^{-/-}, démontrant le rôle essentiel des T CD8 dans la thérapie cellulaire (figure 20g). Dans la même expérience, nous avons aussi évalué l'effet d'un anticorps bloquant anti-CD25 ciblant principalement les Treg (étant donné leur surexpression par rapport aux autres sous-types). Nous avons observé une diminution de foyers tumoraux chez les souris ayant reçu des Th17 WT. En revanche, l'anti-CD25 n'a pas amélioré l'effet antitumoral du transfert de Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-} (figure 20h). Ces données suggèrent que cibler NLRP3 dans les T CD4 pourrait avoir un intérêt thérapeutique.

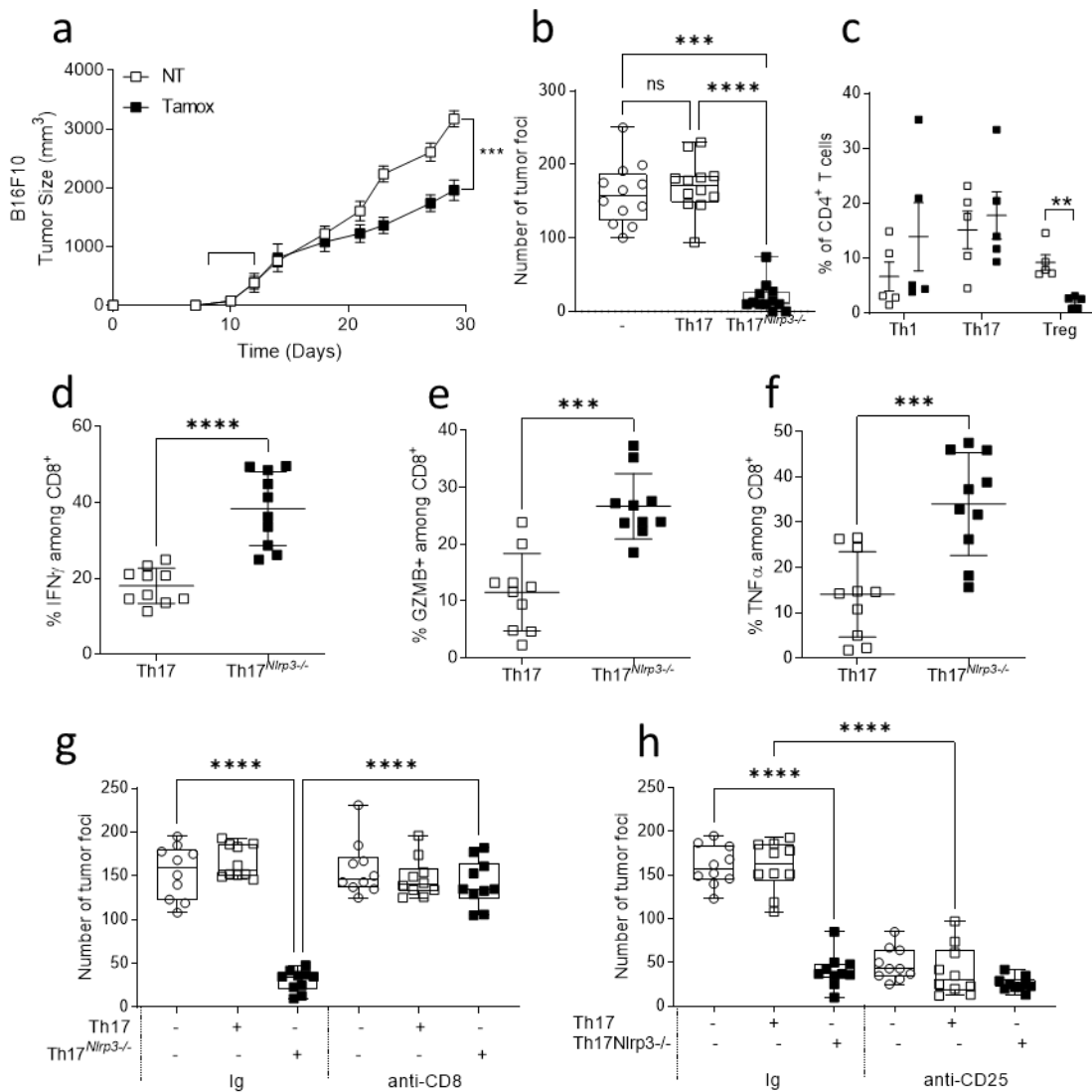


Figure 20 : NLRP3 est une cible potentielle thérapeutique. Analyse de la croissance tumorale de cellules de mélanome B16F10 injectées en sous-cutanée dans des souris CD4 Cre^{ERT2} *Nlrp3*^{flx/flx} gavées ou non par du tamoxifène (les crochets représentent les jours de gavage au Tamoxifène, n=5 souris par groupe) (a). Analyse des foyers tumoraux pulmonaires issus de l'injection en intraveineuse de cellules B16OVA treize jours après injection en intraveineuse de Th17 OT II WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} (b). Proportion des sous-types de T CD4 (Th1, Th17, Treg) infiltrant les poumons de souris injectées par des cellules B16OVA treize jours après l'injection en intraveineuse de Th17 OT II WT (carrés blanc) ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} (carrés noir) (c). Analyse par cytométrie en flux de la production d'IFN-γ (d), de granzyme B (e) et de TNF-α (f) des T CD8 infiltrant les poumons des souris décrites en (b). Nombre de foyers tumoraux dans des souris injectées ou non par des Th17 OT II WT ou CD4 *Nlrp3*^{-/-} en combinaison ou non d'anticorps bloquant anti-CD8 (g) ou anti-CD25 (h). Les données montrées représentent 3 expériences indépendantes. La significativité statistique a été évaluée par des tests de Kruskal-Wallis (a, b, g, h) et Mann-Withney (c-f), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001, n=3.

Article 2

Rôle de NLRP3 dans la biologie des lymphocytes T CD8

C. Hibos, L. Milian, L. Clerc, F. Chalmin, M. Geindreau, J. Melin, A. Micallef, T. Accogli, E. Humblin, E. Jacquin, R. Boidot, M. Bruchard, R. Mary, A. Bernard, F. Ghiringhelli, F. Vegran

INTRODUCTION

Le système immunitaire est capable de reconnaître et de cibler les cellules tumorales. Malheureusement, à la suite de la dernière phase de l'immunoéditing, l'échappement, celui-ci finit par devenir dysfonctionnel, voire délétère. Ce phénomène se traduit par la sénescence des cellules, l'expression de récepteurs inhibiteurs à la leur surface, la diminution des sécrétions de molécules inflammatoires, etc.

Les lymphocytes T CD8 sont connus pour être de bon pronostic lorsqu'ils infiltrent la tumeur¹⁵. Ils sont capables de proliférer, d'être cytotoxiques et de sécréter des molécules pro-inflammatoires comme l'IL-2, le granzyme B, l'IFN- γ ou le TNF- α , qui conduisent au recrutement et à l'activation d'autres cellules immunitaires. Les T CD8 deviennent néanmoins dysfonctionnels au cours du développement des tumeurs à cause de la stimulation chronique de ceux-ci, dans un environnement immunosuppresseur défavorable. Cette perte de fonction est consécutive de la co-expression des points de contrôles inhibiteurs par les T CD8, comme PD-1, Tim-3, LAG-3 et bien d'autres. Les T CD8 sont ensuite incapables de proliférer et de produire leurs cytokines effectrices.

NLRP3 est une protéine initialement décrite pour son implication dans l'inflammasome, dont le rôle dans les lignées myéloïdes est d'activer les caspases 1 et 8, nécessaires à la sécrétion d'interleukine 1 β (IL-1 β) et d'interleukine 18 (IL-18), en réponse à un pathogène. Les travaux précédents de l'équipe ont mis en lumière un rôle de NLRP3 dans les populations lymphoïdes, bien que ne sécrétant ni IL-1 β ni IL-18. Il a d'abord été étudié dans les lymphocytes Th2, où il a été montré que NLRP3 participe au contrôle de la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs Th2. Pour exercer son rôle, NLRP3 s'associe avec IRF4, afin de se fixer sur le promoteur du gène codant pour l'IL-4. Nous avons ensuite démontré dans les lymphocytes Th17, le lien entre NLRP3 et l'immunosuppression médiée par la voie du TGF- β .

Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire ont montré que les lymphocytes T CD8 pourraient, eux aussi, être sujets à des modifications de leur phénotype lorsqu'ils sont déficients pour NLRP3.

Le rôle de ce projet est d'étudier le rôle de NLRP3 dans la biologie des lymphocytes T CD8, ainsi que son impact sur la réponse immunitaire antitumorale

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Souris, croissances tumorales et traitements

Les souris C57BL/6J proviennent des laboratoires Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Les souris *Nlrp3*^{-/-}, proviennent de l'élevage du CDTA (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal ; Orléans, France), les souris *CD8*^{cre} x *Nlrp3*^{flox/flox} sont en reproduction au centre de zootechnie de Dijon, les souris *CD8*^{cre} proviennent du Jackson Laboratory (C57BL/6-Tg (Cd8a-cre) 1Itan/J) et les souris C57Bl6 Ly5.1a ont généreusement été fournies par le Pr. Apetoh. Tous les animaux ont été traités et élevés conformément aux recommandations de la FELASA et du comité d'éthique en expérimentation animale (Université de Bourgogne, France). Les souris utilisées pour les expériences sont des femelles et des mâles âgés de 6 et 12 semaines.

Pour induire la formation de tumeurs sous-cutanées, 3.10⁵ cellules de mélanome B16F10, de mélanome B16K1 exprimant le CMH-I de manière stable, de cancer du côlon MC38 MSI, de cancer du poumon TC1 ou de cancer du poumon LLC1 ont été injectées. Les lignées cellulaires venant de l'ATCC ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté par 10% (vol/vol) de sérum de veau foetal (SVF), 1% (vol/vol) de Pénicilline Streptomycine Amphotéricine B (PSA) et 4 mM d'acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique (HEPES). Les tumeurs ont été mesurées tous les 3 jours à l'aide d'un pied à coulisse.

Les traitements par inhibiteurs de NLRP3 (MCC950) ou par Anakinra, ont été réalisés tous les jours pendant 3 jours, puis deux fois par semaine en IP, pour une quantité de 30µg/souris.

Purification et différenciation *in vitro* des lymphocytes T CD8

Les cellules murines ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 avec 10% (vol/vol) de sérum de veau foetal et supplémenté avec des acides aminés non-essentiels, du sodium pyruvate, des antibiotiques (PSA) et 4mM d'HEPES. Les cellules murines T CD8⁺ naïves (CD8⁺, CD62L⁺, CD44⁻) ou totales, isolées à partir de rates et de ganglions ont été purifiées grâce au kit de séparation magnétique MACS (Naive CD8a T Cell Isolation Kit, mouse, MiltenyiBiotec® et CD8a T Cell Isolation Kit, mouse, MiltenyiBiotec®). La pureté des cellules T CD8 extraites a été contrôlée par cytométrie en flux et est supérieure à 95%. Les lymphocytes T CD8 sont stimulés dans les plaques de culture par des anticorps de revêtement dirigés contre CD3 (145-2C11, 2µg/ml) et CD28 (PV-1, 2 µg/ml). Quand précisé dans le texte, les cellules ont été traitées par :

TGF-β (2ng.mL⁻¹, 130-095-067, MiltenyiBiotec®), IL-2 (400ng.mL⁻¹, 130-120-662, MiltenyiBiotec®), IL-1β (401-ML, R&D) IL-18 (9139-IL, R&D), inhibiteur de STAT-5 (3.5µM pendant une heure, 420294-10MG, Merck) inhibiteur de caspase 1 Z-YVAD (20µM,

Selleckchem), de caspase 8 Z-IETD (30µM, Selleckchem), de l'inflammasome (MCC950, 10µM, Merck), de l'IL-1β (Anakinra, 500ng.mL⁻¹, MedChemExpress), de la kinase IV du récepteur au TGF-β (SB431542, 5µM, Calbiochem), de SMAD3 (SIS3, 10µM, Merck), de PI3K (LY294002, 325 nM, Selleckchem), de P38 (SB203580, 10µM, Selleckchem), de ROCK (Y27632, 10µM, Selleckchem), JNK Inhibitor II (10µM, Merck), LPS (10µM, L3024-5MG, Merck), ATP (5mM, A7699-1G, Merck)

Cytométrie en flux

Les cellules marquées ont été passées sur le cytomètre Fortessa (BD) puis analysées par le logiciel FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA). Les cellules ont été étudiées après le temps et les traitements indiqués dans les figures. Les échantillons ont été découpés en petits fragments (<0.5mm) suivi d'une dissociation enzymatique par la machine gentleMACS™ Octo dissociator Miltenyi® selon les recommandations du fournisseur (Tumor dissociation kit, Miltenyi®). Les lysats ont été passés sur filtre (70µm) et lavés avec du PBS 1X. Les lysats ont été enrichis en cellules CD45⁺ grâce au kit « CD45TIL Microbeads, mouse » et aux colonnes magnétiques de Miltenyi® Biotec. Après centrifugation, les suspensions cellulaires ont été incubées 3h à 37°C dans du RPMI 5% SVF supplémenté avec 0.2% du kit « Cell Stimulation Cocktail plus protein transport inhibitors » (ref: 00-4975-93, eBioscience). Les cellules ont ensuite été marquées par des anticorps ciblant des protéines membranaires dans un tampon de marquage (Flow Cytometry Staining Buffer, ref: 00-422-26, eBioscience). Les anticorps utilisés sont : CD45-BUV395 (ref 564279 BD Biosciences, clone 30-F11), CD8a-UV395 (ref 563786 BD Biosciences clone 53-6.7), CD8a-UV805 (ref 612898 BD Biosciences, clone 53-6.7), CD45.2-BV421 (ref 560697 BD Biosciences, clone 104), PD-1-Vioblue (CD279) (ref 130-121-437 MiltenyiBiotec, clone HA2-7B1), IFN-γ BV421 (ref 563376 BD Biosciences, clone XMG1.2) TNF-α-BV510 (ref 506339 BioLegend, clone MPGXT22) Ki67-BV605 (ref 652413 BioLegend, clone 16A8), CCR6-BV605 (ref 128819 BioLegend, clone 29-2L17), CX3CR1-BV711 (ref 149031 BioLegend, clone SA011F11), CXCR3-FITC (ref 130-111-092 MiltenyiBiotec, clone REA724), IL-2-FITC (ref 503806 BioLegend, clone JE56-5#4), CD44-PerCP-Cya5.5 (ref 560570 BD Biosciences, clone im7), Granzyme B-PE (ref 130-116-486 Miltenyi Biotec, clone rea226), CCR7-PE (ref 120106 BioLegend, clone 4B12), CD69-Pe-Cya5 (ref 104510 BioLegend, clone H1.2F3), Tim-3-Pe-Cya7 (ref 119716 BioLegend, clone RMT3-23), Tox-APC (ref 130-118-335 MiltenyiBiotec, clone REA473), NLRP3-APC (ref 130-111-210 MiltenyiBiotec, clone REA-668), CD62L-APC-R700 (ref 104426 BioLegend, clone MEL-14) IFN-γ-APC-Cy7 (ref 561479 BD Biosciences, clone XMG1.2), la viabilité a été marquée en utilisant les FVS de BD Horizon™ : FVS450 (ref 562247), FVS510 (ref 564406), FVS575V (ref 565694), FVS620 (ref 564996), FVS780 (ref 565388). Le tri cellulaire, quant à lui, a été réalisé grâce au trieur ARIAII (BD).

ELISA

Les cytokines sécrétées ont été dosées par ELISA pour l'IL-1β (DY401-05, kit R&D), l'IL-18 (BMS618-3, Thermofisher) le CXCL9, 10 et 11 (DY492, DY466, DY572, R&D), l'IFN-γ (551866,

BD Biosciences), l'IL-2 (555148, BD Biosciences) et le TNF- α (555268, BD Biosciences) selon les recommandations du fabricant.

Immunofluorescence (IF) et expérience de ligation par proximité (PLA)

1.10^6 cellules sont lavées et fixées pendant 10min à température ambiante (RT) avec une solution de paraformaldéhyde (PFA, 4%), puis perméabilisées pendant 10min sur glace par du méthanol glacial pur. Afin de saturer les sites de fixation aspécifiques, les cellules incubent pendant 1h à RT dans du PBS 1X, supplémenté par 5% (vol/vol) de SVF. Les échantillons sont incubés sur la nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-NLRP3/NALP3 (1/100^{ème}mAb, Cryo-2, Adipogen), ou anti-SMAD3 (1/50^{ème}CellSignalingTechnology), ou anti-phospho-SMAD3 (1/100^{ème}, Ser423/425, CellSignalingTechnology), ou anti-TGF- β récepteur type I (1/50^{ème}, Sigma Aldrich). Tous les anticorps ont été dilués dans du PBS 1X, 5% SVF. Les anticorps contrôles utilisés dans les expériences d'imagerie sont des isotypes IgG contrôles murins ou lapins (Thermofisher Scientific).

Pour l'immunofluorescence, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X, SVF 5%, puis incubées avec un anticorps secondaire dans le même tampon. Elles sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS 1X, SVF 5% puis deux fois dans de l'eau ultrapure.

Pour les PLA, les cellules ont été incubées 30min à 37°C avec les sondes appropriées (Duolink[®] In Situ PLA[®] Probe Anti-Rabbit PLUS et Anti-Mouse MINUS, Sigma Aldrich), puis 1h40min avec la solution contenant la polymérase, conformément au protocole constructeur.

Pour les deux expériences, les cellules marquées ont été déposées sur des lames de microscopie (Superfrost Ultra Plus[®], ThermoFisher Scientific) et incubées à RT pendant la nuit, jusqu'à évaporation du milieu. Les lames ont été montées par une goutte de Milieu de montage anti-atténuation Gold contenant du DAPI (ref : P36935, ProLong[™]Thermofisher Scientific). Les lames ont été lues au microscope (Axio Imager – M2 microscope, Zeiss) puis les images analysées *via* les logiciels Zeiss et Icy (BioImage Analysis).

Analyse par PCR quantitative

Les ARN messagers totaux ont été extraits par Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 300ng d'ARNm ont été rétro-transcrits en ADNc par le kit TAKARA (PrimeScript[™] RT Master Mix Perfect Real Time). Les ADNc ont été quantifiés par PCR quantitative en temps réel *via* un kit PCR contenant du SYBR Green (AppliedBiosystems) sur la machine ViiA7 (ViiA 7 Real-Time PCR System, Thermofisher Scientific). Les quantités relatives d'ARNm ont été calculées par la méthode du $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ par rapport au gène de ménage codant pour la β -actine (*Actb*) ou la GAPDH (*Gapdh*).

RÉSULTATS

1. NLRP3 est exprimé dans les T CD8 de manière dépendante à l'IL-2

L'expression de NLRP3 a été évaluée par immunofluorescence (figure 1a) et cytométrie en flux (figure 1b) au cours d'une cinétique dans les T CD8 activés *in vitro* par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Les résultats indiquent que NLRP3 est induit au cours de l'activation des T CD8, de manière stable.

L'activation du TCR induit la production d'IL-2. L'IL-2 est responsable de l'expression de NLRP3 dans les Th2. Pour déterminer si l'IL-2 est responsable de cette induction, nous avons dans un premier temps évalué le niveau d'IL-2 produit par les T CD8 au cours de leur activation, par dosage ELISA (non montré). Etant donné que NLRP3 est induit dès le premier jour de stimulation des T CD8, nous avons traité par de l'IL-2 des T CD8, sans activer le signal TCR. De fait, afin de tester l'hypothèse que l'IL-2 induit NLRP3 et de garantir la survie des cellules T CD8, nous les avons traités par environ 10 fois la quantité d'IL-2 qu'ils produisent *in vitro* (400ng.mL⁻¹), prétraités ou non pendant 1 heure par un inhibiteur de STAT5, facteur de transcription dont la phosphorylation est induite par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur. Les résultats obtenus par immunofluorescence montrent que l'expression de NLRP3 est induite par l'IL2 et qu'elle est bloquée en présence de l'inhibiteur de STAT5 (figure 2a et b). Ces résultats ont été reproduits en cytométrie en flux, en présence d'anticorps activateurs anti-CD3 et anti-CD28 (figure 3a et b).

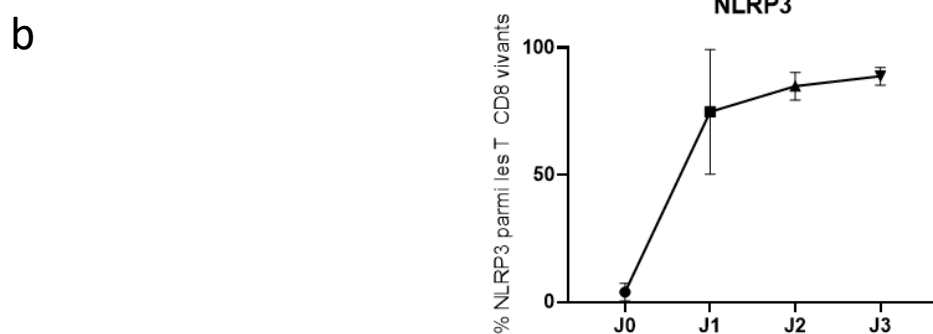
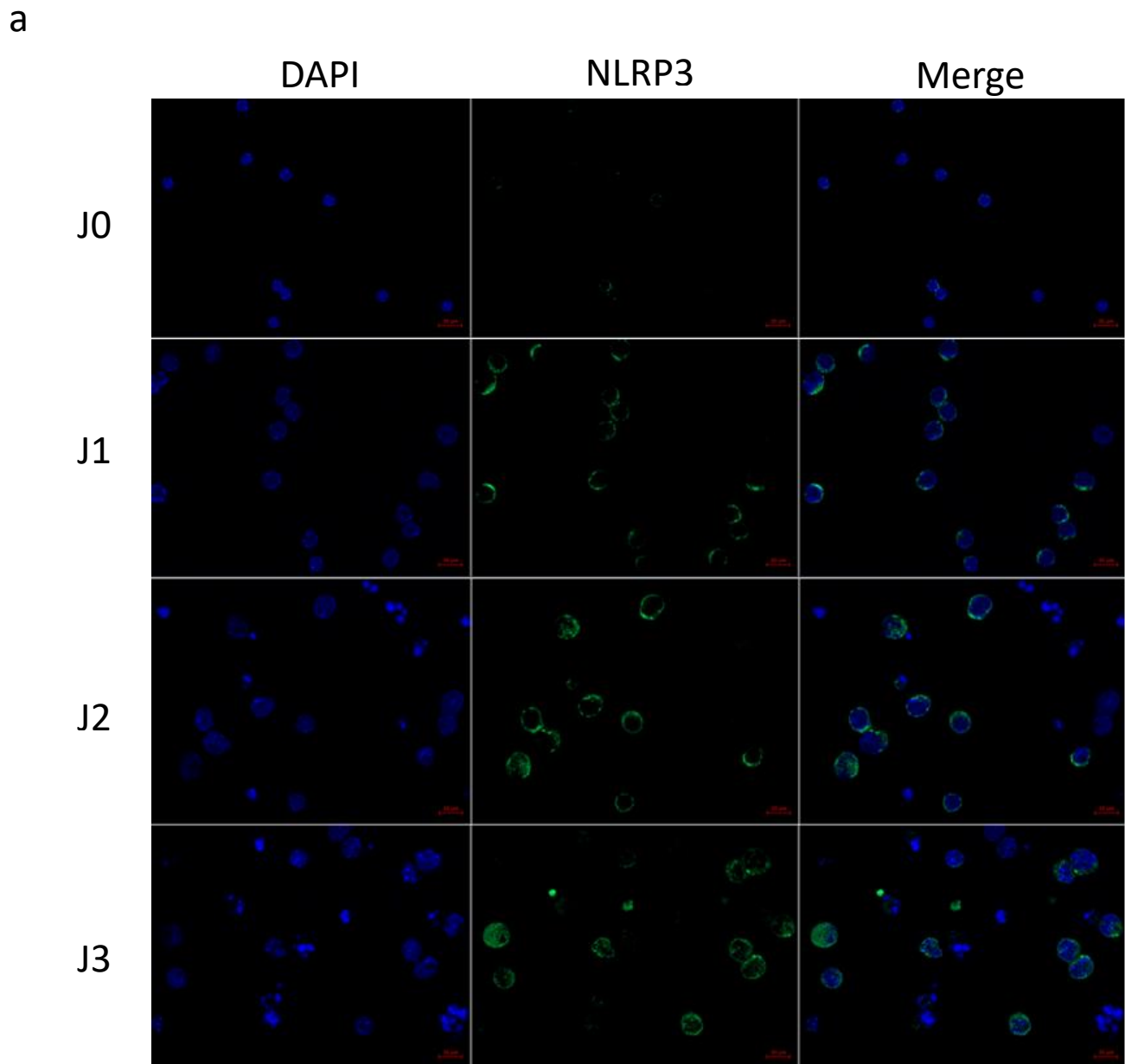


Figure 1: NLRP3 est induit au cours de l'activation *in vitro* des T CD8. Marquage par immunofluorescence (a) ou par cytométrie en flux (b) de NLRP3 dans des cellules T CD8 naïves activées par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 après 0,1,2 ou 3 jours d'activation. NLRP3 est marquée par un anticorps secondaire couplé à de l'AF488 (vert) et le contraste du marquage a été corrigé par retrait du bruit de fond grâce à l'isotype contrôle. En cytométrie en flux, NLRP3 a été marqué par un anticorps couplé à l'APC (n=3).

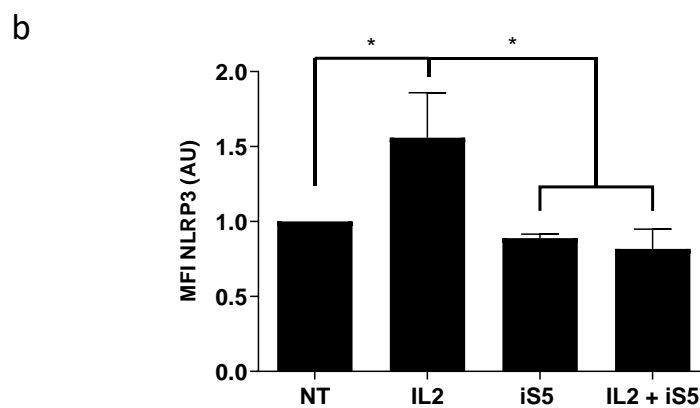
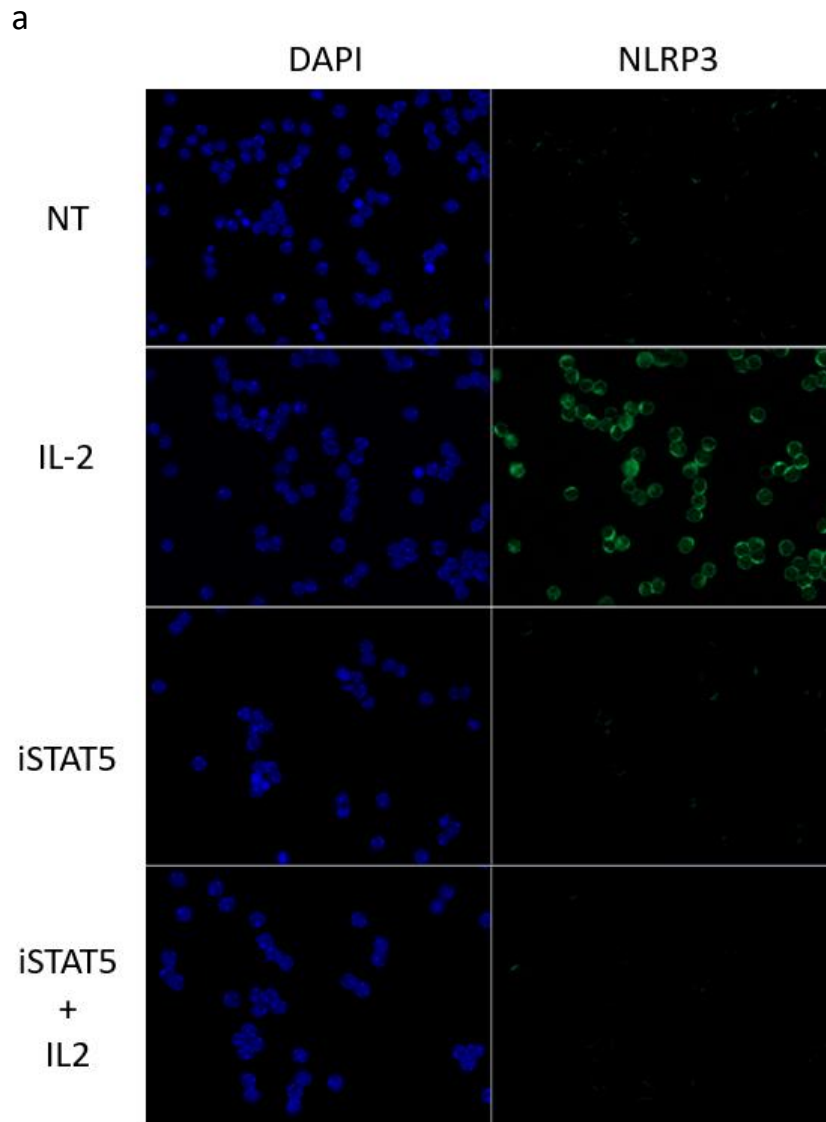


Figure 2 : L'IL-2 induit l'expression de NLRP3 dans les T CD8. Marquage par immunofluorescence par l'AF488 (a) et quantification de la MFI normalisée par rapport aux T CD8 non-traités (b) de NLRP3 dans des cellules T CD8 naïves traitées ou non pendant un jour par de l'IL-2 (400ng.mL⁻¹), prétraités ou non pendant 1 heure par un inhibiteur de STAT5 (iSTAT5 ou iS5). La significativité statistique a été évaluée par 1-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey, *p<0.05, n=4.

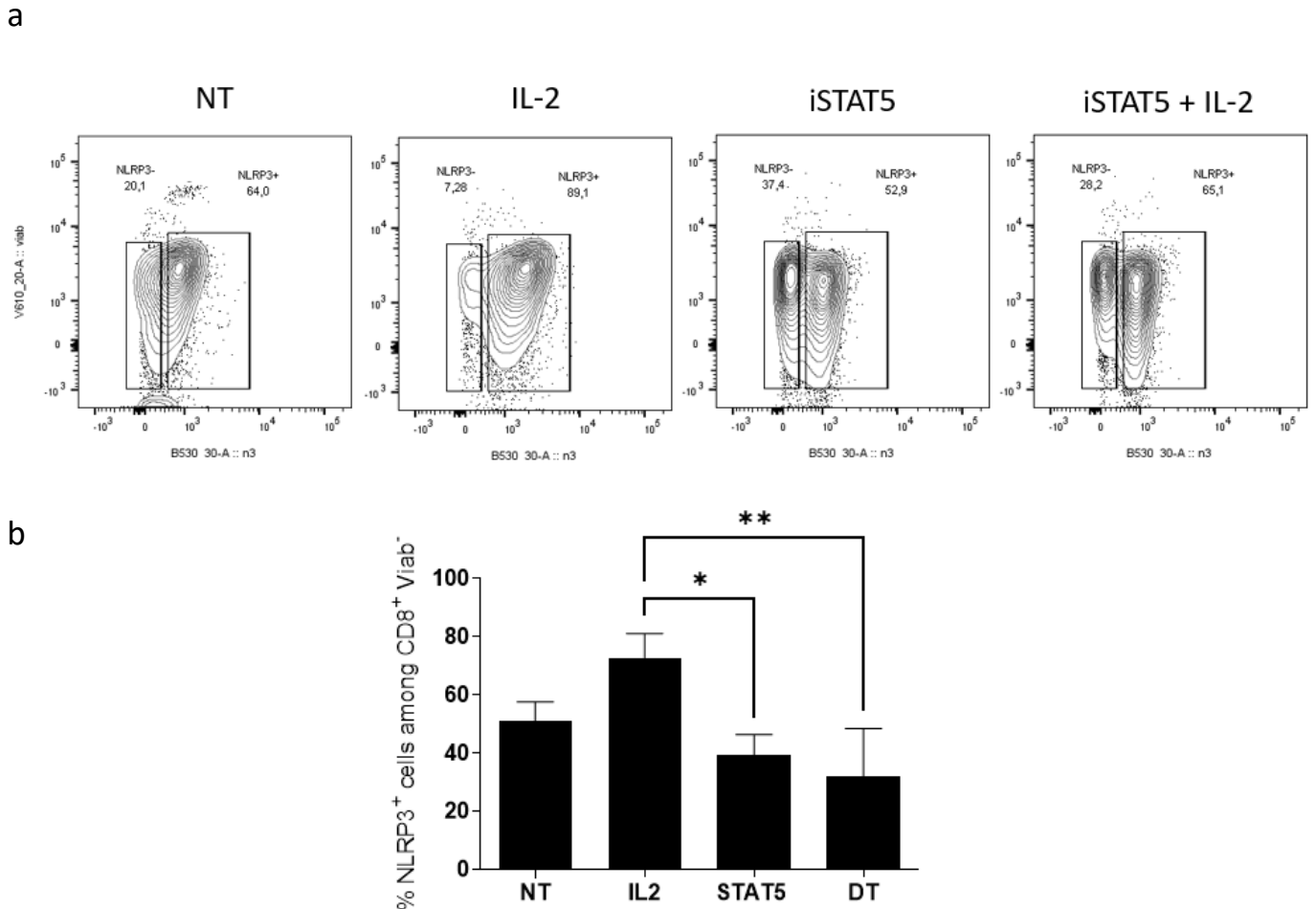


Figure 3 : L'IL-2 induit l'expression de NLRP3 dans les T CD8. Marquage par cytométrie en flux (a) et quantification de la proportion de cellules T CD8 positives pour NLRP3, traitées ou non pendant un jour par de l'IL-2 (400ng.mL⁻¹), prétraitées ou non pendant une heure par un inhibiteur de STAT5 (iSTAT5 ou iS5), durant un jour d'activation par anticorps anti-CD3 et anti-CD28. L'ordonnée correspond à la viabilité et l'abscisse au signal NLRP3 (marqué par AF488). La significativité statistique a été évaluée par 1-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey *p<0.05 **p<0.01, n=3.

2. NLRP3 possède un rôle indépendant de l'inflammasome dans la biologie des T CD8

Pour déterminer le rôle de NLRP3 dans la biologie des T CD8, nous avons trié des T CD8 naïfs de souris C57bl6 WT et déficientes pour NLRP3 (KO), que nous avons ensuite activés *in vitro* pendant 1 jour, avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Dans un premier temps, nous avons comparé l'expression des gènes codants pour les cytokines IFN- γ , TNF- α et l'IL-2 (figure 4a-c). Les résultats montrent qu'après un jour de stimulation, les T CD8 KO ont une plus grande expression des gènes codants pour les cytokines effectrices des T CD8, à l'exception du granzyme B (non-montré). Nous avons confirmé ces résultats par un dosage ELISA (figure 4d-f) et un marquage intra-cellulaire de l'IFN- γ et du TNF- α (figure 4g et h) après 1 ou 2 jours de stimulation *in vitro*.

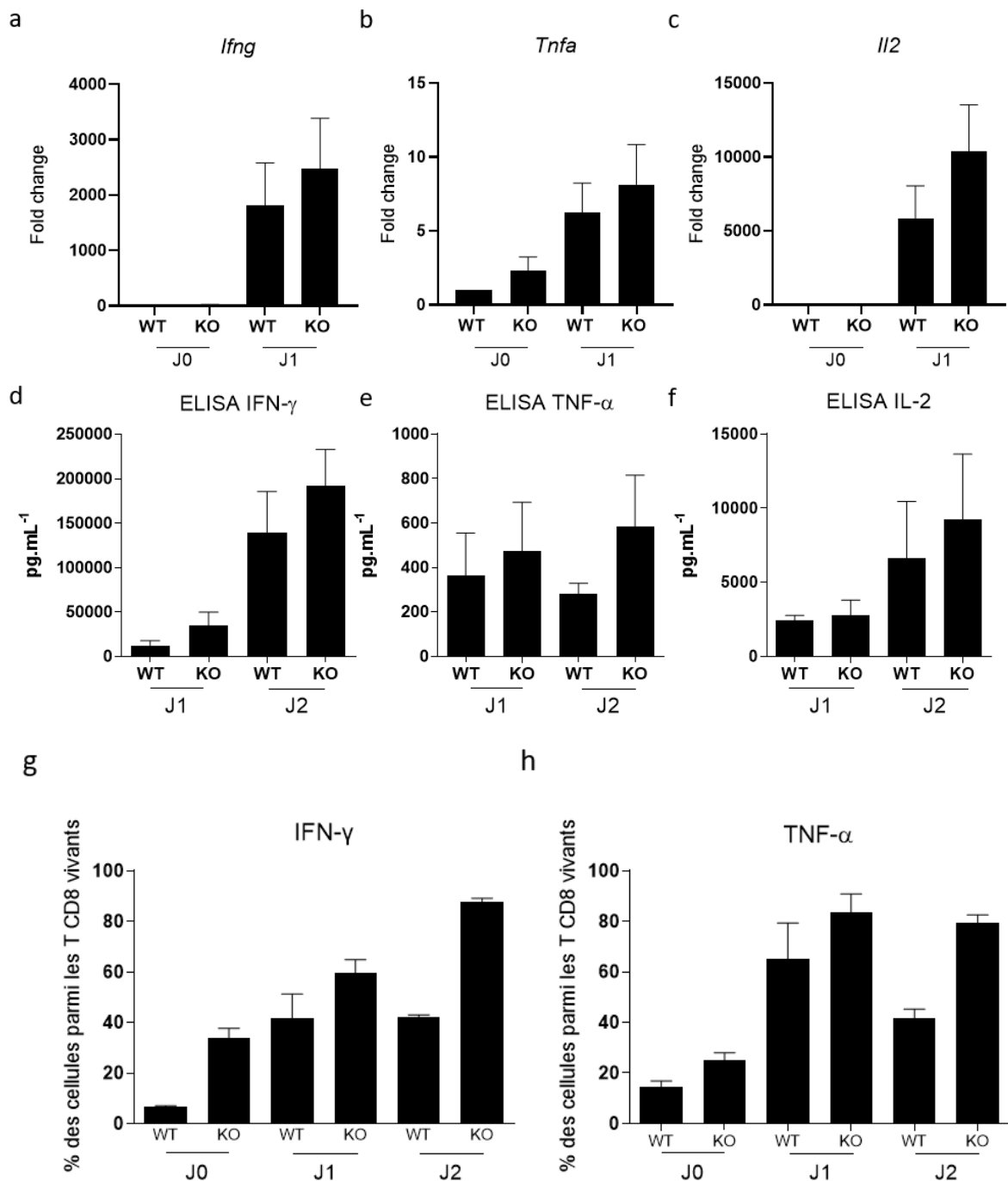


Figure 4 : Les T CD8 *Nlrp3* KO expriment plus de cytokines effectrices. Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes *Ifng* (a), *Tnfa* (b) et *Il2* (c) normalisé par rapport à l'expression du gène *Gapdh* après 1 jour de stimulation *in vitro* par anti-CD3 et anti-CD28 de T CD8 naïfs sauvages (WT) ou *Nlrp3* KO. Analyse par dosage ELISA de la quantité d'IFN- γ (d), le TNF- α (e) et l'IL-2 (f) présente dans le surnageant de culture après 1 et 2 jours de stimulation *in vitro* par anti-CD3 et anti-CD28 de T CD8 naïfs WT ou *Nlrp3* KO. Analyse par marquage intracellulaire en cytométrie en flux des cellules sécrétant de l'IFN- γ (g) ou du TNF- α (h) après 1 et 2 jours de stimulation *in vitro* par anti-CD3 et anti-CD28 de T CD8 naïfs WT ou *Nlrp3* KO, n=2.

NLRP3 est connu pour son rôle dans l'inflammasome, qui déclenche le clivage des caspases-1 et/ou 8, puis la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18^{5,17}. Afin de tester son activation, nous avons utilisé des lignées immortalisées de macrophages J774A.1, ainsi que des T CD8 isolés de rate de souris C57Bl6 WT. Nous les avons traités par des activateurs classiques de l'inflammasome (LPS pendant 12h, puis ATP pendant deux heures), puis nous avons dosé par ELISA les cytokines sécrétées. Les résultats montrent que contrairement aux macrophages, les T CD8 ne produisent pas d'IL-1 β ni d'IL-18 après stimulation par LPS et ATP (figure 5a et b).

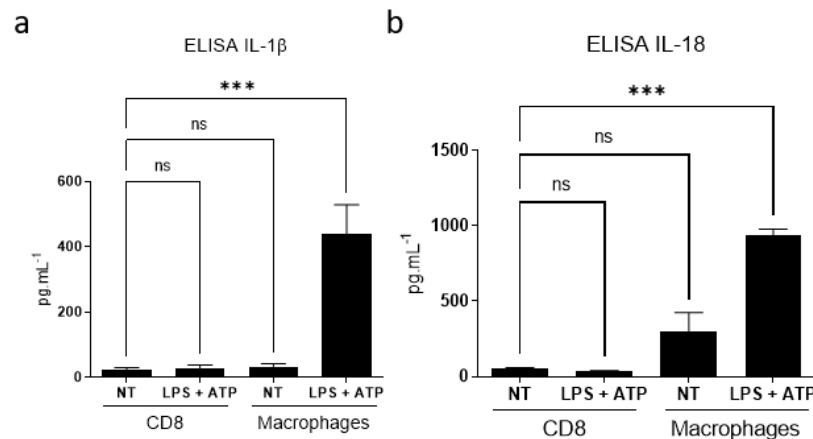


Figure 5 : Les T CD8 ne produisent pas d'IL-1 β ni d'IL-18 *in vitro* en réponse au LPS et à l'ATP. Analyse par ELISA de la sécrétion d'IL-1 β (a) et d'IL-18 (b) dans le surnageant de T CD8 WT activés *in vitro* pendant un jour par anti-CD3 et CD28. Les T CD8 et les macrophages ont été traités ou non par du LPS (100ng.mL⁻¹) pendant 12h en tant que premier signal, puis par de l'ATP (5mM) en tant que second signal pendant deux heures. La significativité statistique a été évaluée par 1-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey, ***p<0.005, n=3.

L'IL-1 β et l'IL-18 sont les produits terminaux générés par l'activation de l'inflammasome. Bien que n'en ayant pas détecté, nous avons cherché à savoir si ces cytokines pouvaient avoir ou non un impact sur les T CD8. Pour cela, nous avons dosé l'IL-1 β présent dans le surnageant de broyats de tumeurs de mélanome B16F10, injectées en sous-cutanée dans des souris WT ou *Nlrp3* KO, afin de déterminer la quantité d'IL-1 β en contact avec les T CD8 infiltrant les tumeurs (figure 6a). Par la suite, nous avons traité *in vitro* les T CD8 WT avec une dose croissante d'IL-1 β , puis nous avons dosé l'IFN- γ par ELISA après 24h (figure 6b) et 48h (figure 6c) d'activation. Les résultats ne montrent aucune différence de sécrétion d'IFN- γ , que les T CD8 soient traités ou non par de l'IL-1 β .

Nous avons confirmé ces résultats par cytométrie en flux, en traitant *in vitro* les T CD8 soit par de l'IL-1 β , de l'IL-18, par les deux, ou bien par de l'Anakinra, un inhibiteur de l'IL-1RA. Après un jour de traitement et de stimulation *in vitro*, par des anti-CD3 et CD28, nous avons réalisé un marquage intracellulaire des cytokines effectrices des T CD8 (figure 6d-h) et des marqueurs membranaires de leur activation (figure 6d et e). Dans nos conditions, les traitements ne montrent aucune différence significative d'activation des T CD8 par l'IL-1 β ou l'IL-18.

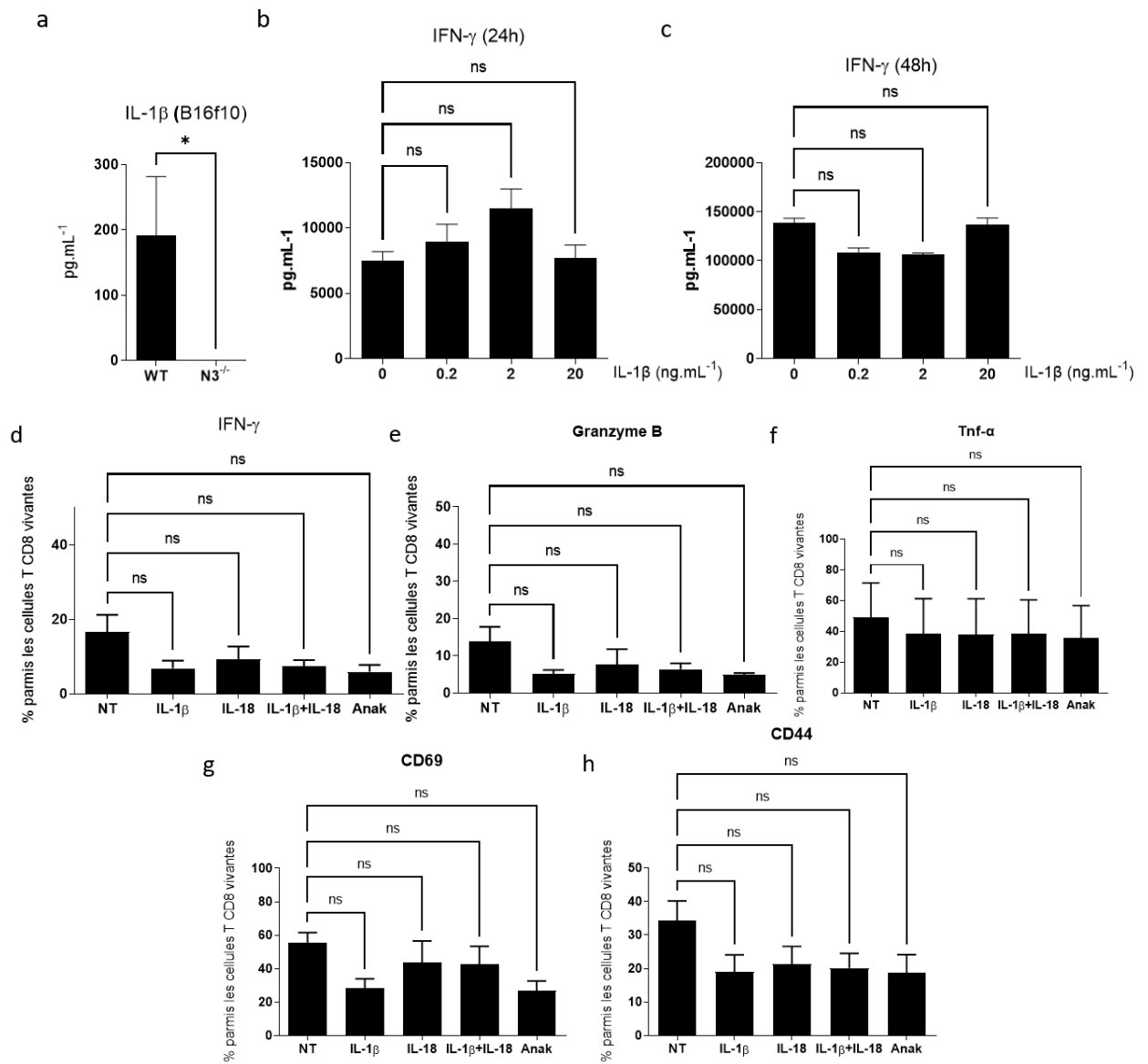


Figure 6 : Les traitements *in vitro* par IL-1β ou IL-18 n'ont pas d'impact sur les T CD8. Dosage ELISA de l'IL-1β présente dans les broyats de tumeurs de mélanome B16F10, injectées en sous-cutanée à des souris WT ou *Nlrp3* KO après 10 jours de croissance tumorale (a). Dosage ELISA de l'IFN-γ dans le surnageant de T CD8 activés pendant 1 ou 2 jours par anti-CD3 et CD28, traités ou non par une dose croissante d'IL-1β (b-c). Marquage par cytométrie en flux des cytokines effectrices des T CD8, l'IFN-γ (d), le Granzyme B (e) et le TNF-α (f) ou des marqueurs membranaires d'activation CD69 (g) ou CD44 (h) après 1 jour d'activation, traités ou non par de l'IL-1β (10ng.mL⁻¹), de l'IL-18 (10ng.mL⁻¹), les deux, ou un inhibiteur de l'IL-1β (Anakinra, 500ng.mL⁻¹). La significativité statistique a été évaluée par des tests de Mann-Whitney, *p<0.05 (a, n=5) et 1-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey (b-h, n=3).

Après avoir testé la voie de l'IL-1 β , nous avons étudié si l'inflammasome avait un rôle dans les T CD8. Dans ce but, nous avons inhibé les caspases-1 et 8, caspases effectrices de l'inflammasome, puis nous avons testé la sécrétion d'IFN- γ des T CD8. À l'inverse des T CD8 KO, les résultats montrent que l'inhibition *in vitro* des caspases-1 par le Z-YVAD et 8 par le Z-IETD diminue la sécrétion d'IFN- γ (figure 7a). De plus, nous avons montré qu'il n'y a pas de différence dans la croissance tumorale entre des souris C56Bl6 WT ou *Casp1*^{-/-}, que nous avons injecté avec des cellules de cancer du côlon MC38 (figure 7b). Par la suite, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de NLRP3 afin de bloquer l'inflammasome dans les T CD8, puis nous avons dosé l'IFN- γ (figure 7c) le TNF- α (figure 7d) et l'IL-2 (figure 7e) dans le surnageant de culture de T CD8 WT ou KO activés par des anticorps anti-CD3 et CD28 pendant 1 ou 2 jours et traités ou non par du MCC950. Les résultats montrent que les traitements *in vitro* au MCC950 n'ont aucun impact sur la sécrétion des cytokines effectrices des T CD8. Nous avons confirmé ces résultats *in vivo* en comparant la croissance tumorale chez des souris injectées par des cellules de cancer du côlon MC38, traitées ou non par du MCC950 ou de l'Anakinra (figure 7f).

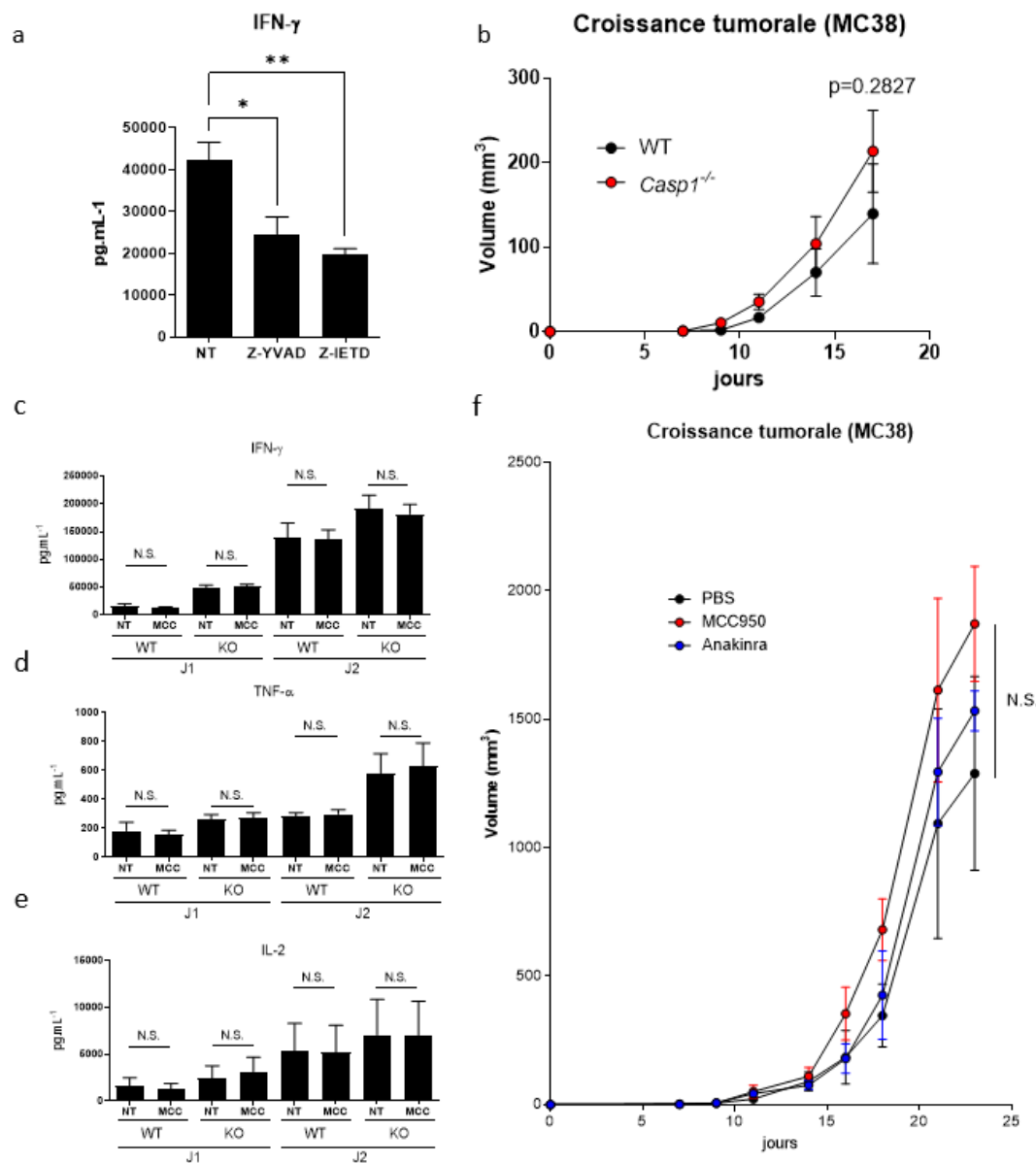


Figure 7 : l'inflammasome n'est pas impliqué dans la biologie des T CD8. Dosage de la quantité d'IFN- γ présente dans le surnageant de T CD8 naïfs activés pendant 1 jour par des anticorps anti-CD3 et CD28 et traités ou non par inhibiteur de la caspase-1 (Z-YVAD, 20 μ M) et de la caspase-8 (Z-IET, 30 μ M) (a). Analyse de la croissance tumorale de cellules MC38 chez des souris C57Bl6 WT ou Caspase-1^{-/-} (b). Dosage ELISA de l'IFN- γ (c) du TNF- α (d) et de l'IL-2 (e) présents dans le surnageant de T CD8 WT ou NLRP3 KO, activés pendant 1 ou 2 jours par des anticorps anti-CD3 et CD28 et traités ou non par un inhibiteur de l'inflammasome (MCC950, 10 μ M). Analyse de la croissance tumorale chez des souris C57Bl6 WT traitées ou non par du MCC950 (30 μ g/souris) et de l'Anakinra (30 μ g/souris) (f). Les tests statistiques réalisés sont des tests 1-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey (a, c-e, n=3, *p<0.05 **p<0.01) et 2-way ANOVA avec comparaison multiple (b, n=3 et f, n=5).

Ensemble, ces résultats indiquent que l'inflammasome n'est pas impliqué dans l'augmentation de la sécrétion des cytokines effectrices des T CD8, ainsi que dans le ralentissement des croissances tumorales.

3. NLRP3 diminue l'effet antitumoral des T CD8

Le rôle antitumoral des T CD8 a été démontré chez l'humain¹⁵ et chez la souris¹⁸. Pour tester le rôle de NLRP3 dans les lymphocytes T CD8, nous avons d'abord utilisé des souris déficientes pour NLRP3 (KO). Par la suite, nous avons croisé des souris floxées pour l'exon 4 du gène *Nlrp3* avec des souris CD8^{cre}. La Cre-recombinase retire l'exon 4 du gène induisant un codon STOP prématuré, les T CD8 générés par cette méthode seront ainsi dénommés T CD8 *Nlrp3*^{-/-} dans le reste du document.

Nous avons comparé la croissance tumorale de cellules de lignée de cancer du côlon MC38 injectées en sous-cutanée à des souris NLRP3 KO et WT. Ces tumeurs ont un statut MSI et sont considérées comme « chaudes », du fait de leur infiltration par les cellules immunitaires, notamment en T CD8¹⁹. Les résultats montrent un ralentissement de la croissance tumorale chez les souris NLRP3 KO par rapport à leurs contrôles (figure 8a). Nous avons ensuite analysé l'infiltrat en T CD8 par cytométrie en flux. Nos résultats montrent un infiltrat en T CD8 plus important dans les tumeurs des souris NLRP3 KO, ainsi qu'une diminution de leur proportion dans les ganglions (figure 8b et c). La proportion de T CD8 dans les rates des souris est en revanche inchangée (non montrée).

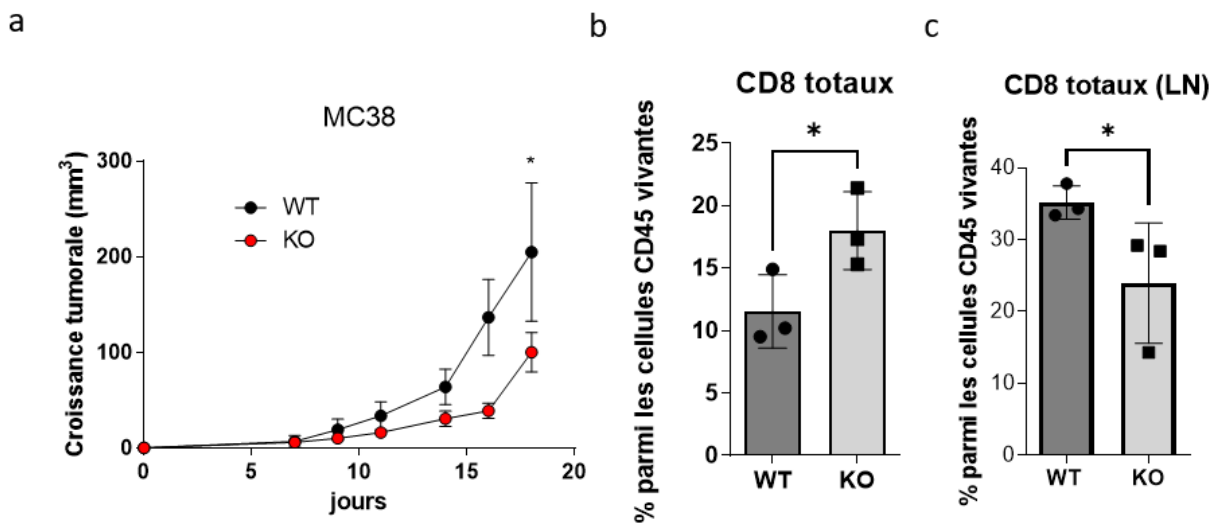


Figure 8 : L'infiltrat en T CD8 est plus important dans les tumeurs des souris *Nlrp3*^{-/-}. Analyse de la croissance tumorale de cellules de côlon MC38 injectées en sous-cutanée dans des souris WT ou NLRP3 KO (a). Analyse par cytométrie en flux de la proportion de T CD8 parmi les cellules CD45 vivantes dans les tumeurs (b) ou les ganglions (c). La significativité statistique a été évaluée par 2-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey (a) et tests de Mann-Withney (b et c), *p<0.05, n=3.

Nous avons étudié trois hypothèses quant à l'augmentation des T CD8 infiltrant : une augmentation de la viabilité, de la prolifération ou du recrutement des T CD8 au sein des tumeurs. Pour cela, nous avons reproduit l'expérience de croissance tumorale de cellules du côlon MC38, injectées en sous-cutanée, mais cette fois à des souris T CD8 *Nlrp3*^{-/-}, ainsi qu'à leurs contrôles. Puis, nous avons étudié les T CD8 infiltrant par cytométrie en flux. Les résultats montrent un ralentissement de la croissance tumorale (figure 9a). L'analyse de l'infiltrat ne montre aucune différence de viabilité (marquage par sonde chimique FVS) ou de prolifération (représentée par le Ki67) des T CD8 *Nlrp3*^{-/-} par rapport à leurs contrôles (figure 9b et c). En revanche, parmi un panel de récepteurs aux chimiokines testé, nous avons montré qu'une plus grande proportion de T CD8 *Nlrp3*^{-/-} exprime CCR7 (figure 9d) et CXCR3 (figure 9e). De plus, la médiane de fluorescence de CXCR3 est plus importante chez les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} que chez les T CD8 WT, indiquant une expression potentiellement plus élevée de CXCR3 chez les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} (figure 9f).

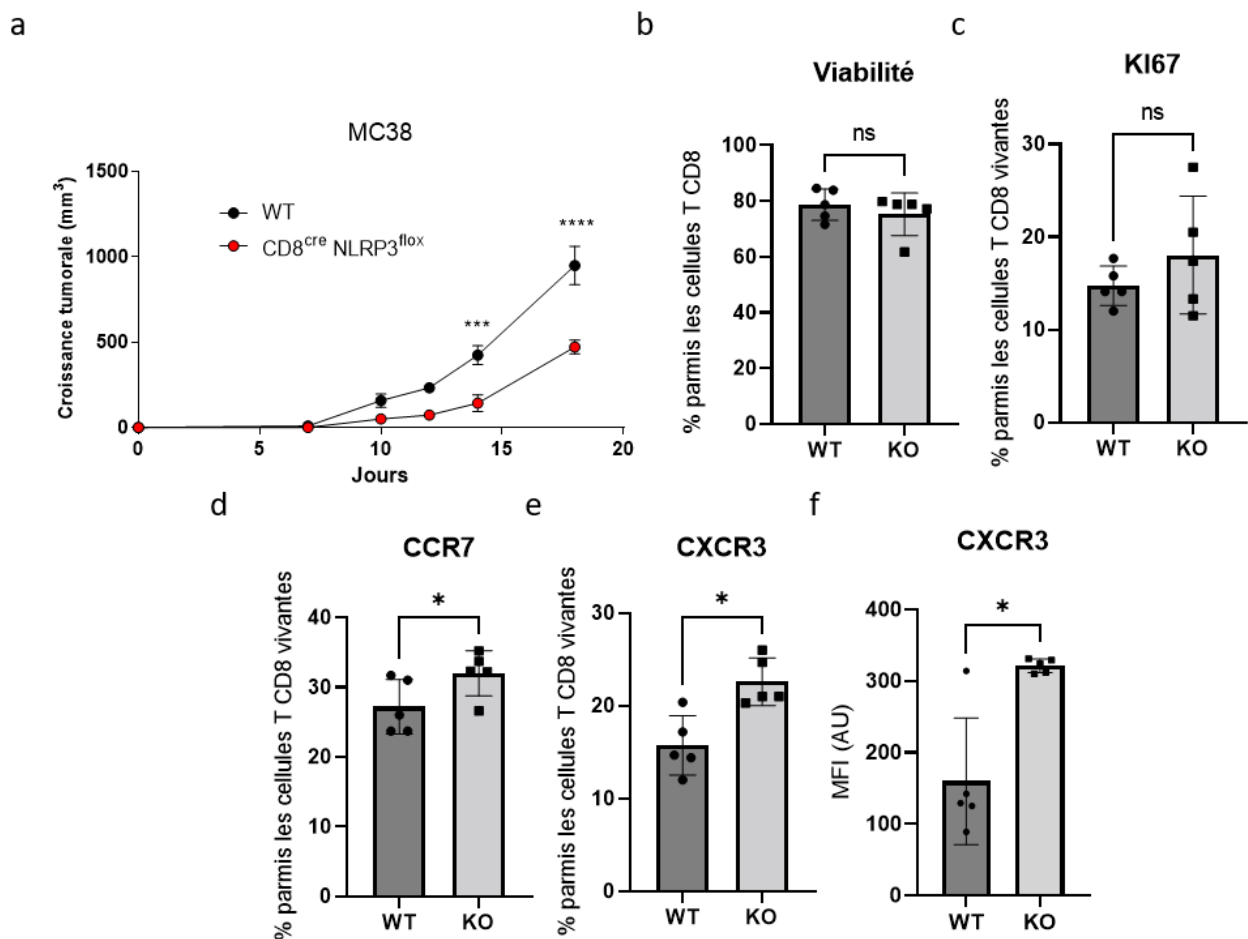


Figure 9 : Les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} ont une expression accrue des récepteurs aux chimiokines. Croissance tumorale de cellules MC38 injectées en sous-cutanée chez des souris WT ou T CD8 *Nlrp3*^{-/-} (a). Analyse par cytométrie de la viabilité des T CD8 infiltrant (b), de leur prolifération (c) et de l'expression de CCR7 (d) et CXCR3 (e). La MFI de CXCR3 est représentée en (f). La significativité statistique a été évaluée par 2-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey (a) et par tests de Mann-Whitney (b-f) *p<0.05, ***p<0.005, ****p<0.001, n=5.

Nous avons reproduit ces résultats dans un modèle de mélanome B16F10. Nos résultats montrent que la croissance tumorale est ralentie chez les souris T CD8 *Nlrp3*^{-/-} (figure 10a). De même, la viabilité et la prolifération des T CD8 *Nlrp3*^{-/-} sont inchangées par rapport à leurs contrôles (figure 10b et c). Nous avons aussi réobtenu un infiltrat plus grand en T CD8 chez les souris T CD8 *Nlrp3*^{-/-} (figure 10d), avec une proportion plus importante de T CD8 exprimant CXCR3 (figure 10e).

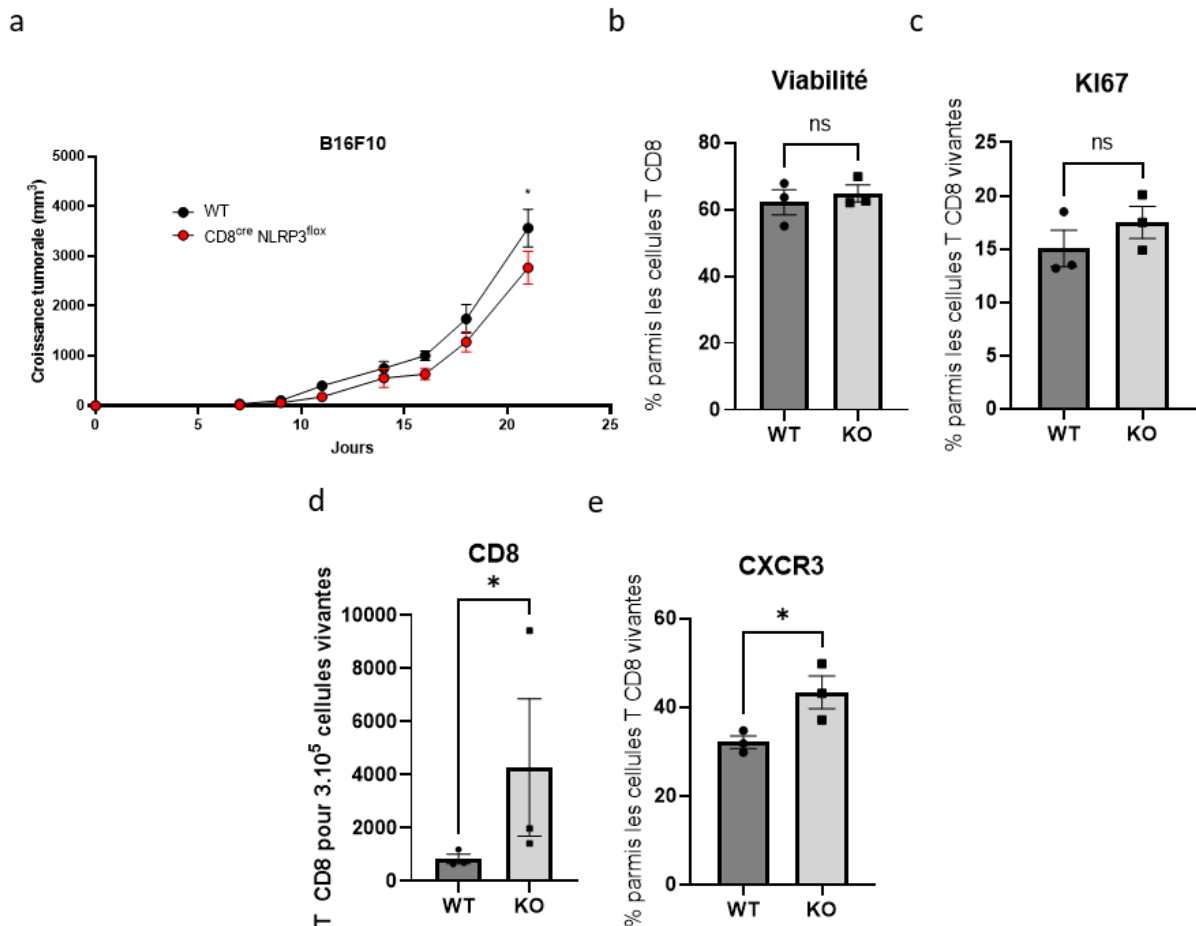


Figure 10 : Les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} influencent également la croissance de tumeurs de mélanome B16F10. Croissance tumorale de cellules B16F10 injectées en sous-cutané chez des souris WT ou T CD8 *Nlrp3*^{-/-} (a). Analyse par cytométrie en flux de la proportion de la viabilité des T CD8 infiltrants (b), de leur viabilité (c) et de l'expression de CCR7 (d) et CXCR3 (e). La MFI de CXCR3 est représentée en (f). La significativité statistique a été évaluée par 2-way ANOVA avec comparaison multiple de Tukey) (a) et par des tests de Mann-Whitney (b-f), *p<0.05, ***p<0.005, ****p<0.001, n=3.

Afin d'approfondir notre compréhension du fonctionnement des T CD8 *Nlrp3*^{-/-} nous avons réalisé un Single-cell RNA-sequencing sur des T CD8 infiltrant des tumeurs issues de cellules de cancer du côlon MC38, chez des souris T CD8 *Nlrp3*^{-/-} et leurs contrôles. Une analyse préliminaire des résultats montre plusieurs clusters surreprésentés dans les T CD8 *Nlrp3*^{-/-}. En comparant aux données obtenues par Hudson *et al.*, (2019), nous avons montré que les principaux clusters 1, 2 et 3 surreprésentés correspondent respectivement à un profil de T CD8 effecteurs mémoires (voie IRF-8/Egr1), de T CD8 en prolifération (voie Foxm1 et des

cyclines) et de T CD8 progéniteurs épuisés (voie Tcf7/Eomes) (figure 11). La liste des gènes est fournie en annexe 1, l'histogramme (droite) est représenté en proportion (pourcentage).

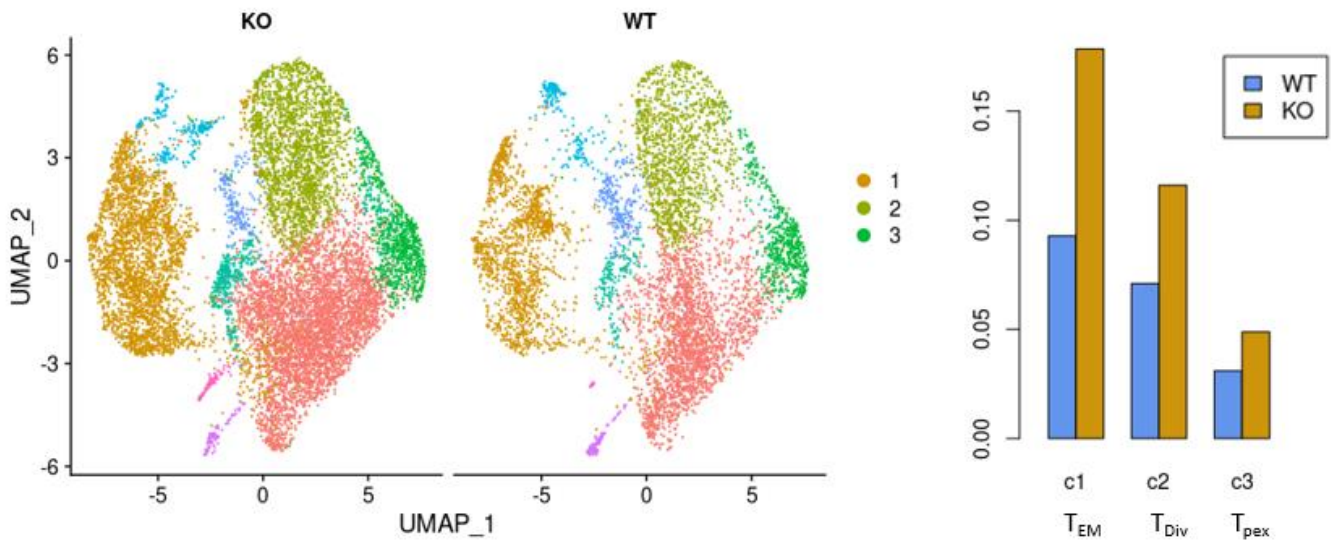


Figure 11 : Les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} ont un profil d'expression génique plus effecteur que leurs contrôles.

Analyse préliminaire des données obtenues par Single-cell RNA-sequencing de T CD8 infiltrant des tumeurs de colon MC38 injectées en sous-cutanée à des souris WT ou T CD8 *Nlrp3*^{-/-}. L'analyse a été réalisée sur 10⁴ cellules T CD8. Les clusters sont représentés graphiquement (gauche) et sous forme d'histogramme (droite, représentant les proportions des cellules). Le phénotype associé aux groupes de T CD8 est indiqué en dessous de l'histogramme : T CD8 effecteurs mémoires (T_{EM}), en division (T_{Div}) et progéniteurs épuisés (T_{pex}).

4. NLRP3 participe à l'immunosuppression médiée par le TGF-β dans les cellules T CD8

Nous avons montré dans les modèles MC38 et B16F10 que les T CD8 sont plus infiltrants et surexpriment CXCR3. Nous avons reproduit les expériences de croissance tumorale dans des tumeurs issues de cellules B16K1 et LLC1. Les cellules B16K1 expriment de manière stable le CMH de type I et permettent d'étudier efficacement la réponse immunitaire antitumorale des T CD8. En revanche, les tumeurs issues de cellules LLC1 ont été décrites comme un modèle très peu immunogène et peu infiltré en cellules immunitaires.

Nos résultats montrent un ralentissement de la croissance tumorale des tumeurs B16K1 chez les souris T CD8 *Nlrp3*^{-/-} par rapport aux T CD8 WT (figure 12a). Cependant, nous n'avons constaté aucune différence dans la croissance des tumeurs LLC1 (figure 12b). Il a été décrit par Gunderson *et al.*, 2020, que l'expression de CXCR3 par les T CD8 infiltrant les tumeurs est inhibée par le TGF-β. De fait, nous avons dosé par ELISA les concentrations de TGF-β et des ligands de CXCR3 (CXCL9,10,11) présentes dans le broyat (TGF-β) ou le surnageant de culture *in vitro* (CXCL9, 10, 11) des différentes tumeurs. Nos résultats montrent que les cellules B16 (F10 et K1) et MC38 sont capables de sécréter du CXCL10 et du TGF-β en faible quantité. De plus, les résultats indiquent que les cellules LLC1 possèdent un profil inverse, ne sécrétant pas de CXCL10 et beaucoup de TGF-β (figure 12c et d). Nous n'avons cependant pas réussi à détecter la sécrétion de CXCL9 et 11 dans nos conditions. Ensemble, ces résultats et ceux

obtenus dans les tumeurs du colon MC38 semblent corrélérer le recrutement de T CD8 observé dans notre modèle de souris T CD8 *Nlrp3*^{-/-} avec CXCR3 et la sécrétion de TGF-β.

Pour déterminer si l'expression de CXCR3 est impactée par l'absence de NLRP3, nous avons activé puis traité par des doses croissantes de TGF-β des T CD8 *Nlrp3*^{-/-} et leurs contrôles. Ensuite, nous avons analysé par RT-qPCR l'expression des gènes codant pour CXCR3 et l'IFN-γ. Les résultats indiquent que l'expression de CXCR3 et de l'IFN-γ sont inhibées par le TGF-β dans les CD8 WT, mais qu'elles se maintiennent dans les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} (figure 13a et b).

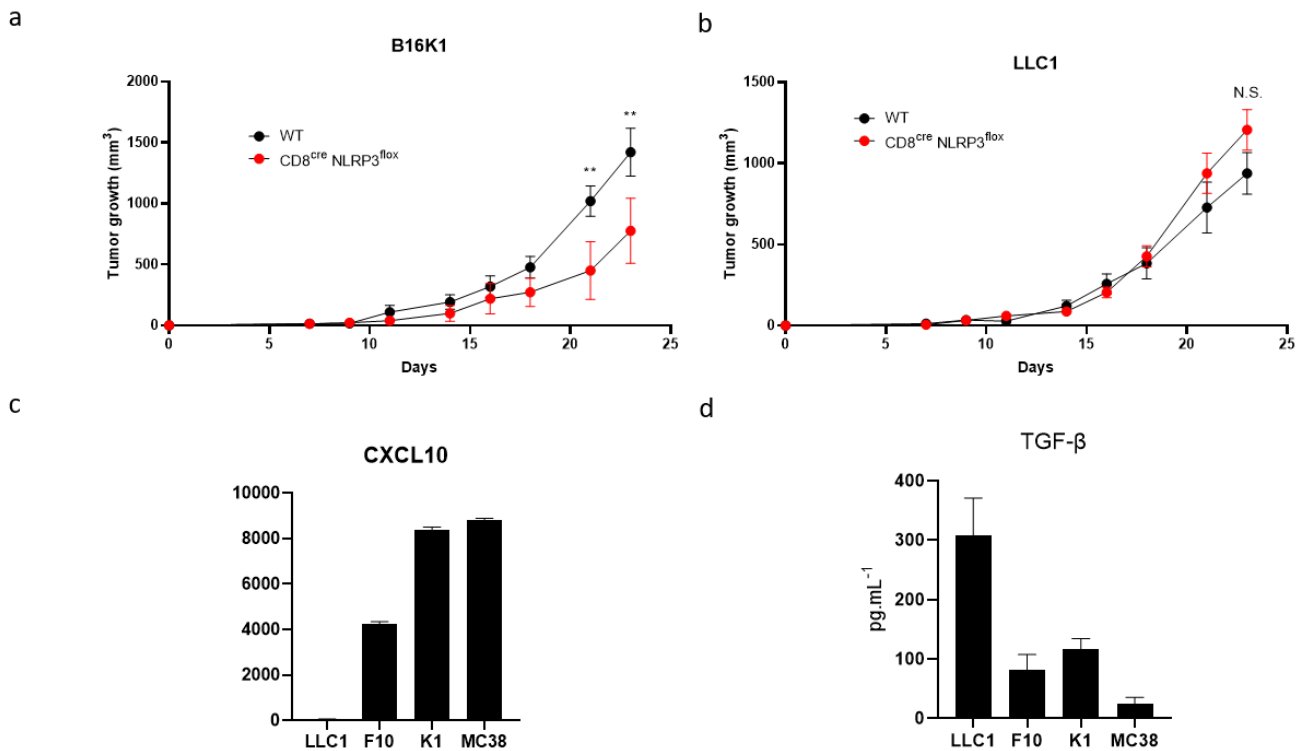


Figure 12 : L'effet de NLRP3 est conditionné par le microenvironnement tumoral. Analyse de la croissance tumorale de tumeurs issues de cellules de mélanome B16K1 (a) ou de cancer du poumon LLC1 (b) chez des souris C57Bl6 WT ou T CD8 *Nlrp3*^{-/-} (CD8^{cre} NLRP3^{fllox}). Dosage par ELISA dans le surnageant de culture *in vitro* (c) ou de broyat de tumeurs (d) de CXCL10 (c) ou de TGF-β (d) (n=5). La significativité statistique a été évaluée par 2-way ANOVA et comparaison multiple de Tukey, ** p<0.01, n=5.

Duan & Derynck, (2019), ont montré que le TGF-β était capable d'induire l'expression de son propre récepteur. Afin d'approfondir notre compréhension du lien existant entre NLRP3 et le TGF-β, nous avons réalisé un marquage par immunofluorescence de NLRP3 et de la sous-unité R1 du récepteur au TGF-β (TGFβR1), après un jour d'activation *in vitro* par des anticorps anti-CD3 et CD28, traités ou non par une dose croissante de TGF-β. Les images indiquent que NLRP3 (vert) et le TGFβR1 (rouge) peuvent être colocalisés (jaune) dans les T CD8 à partir de 0.2 ng.mL⁻¹ de TGF-β (figure 13c). Ensuite, nous avons évalué la probabilité de colocalisation entre NLRP3 et le TGFβR1 par calcul du coefficient de corrélation de Pearson (réalisé avec le logiciel Icy). Celui-ci étant supérieur à 0.9 (figure 13d), nous avons établi qu'il existait une forte probabilité que NLRP3 et le TGFβR1 soient colocalisés. De fait, afin d'établir si NLRP3 et le

TGF β R1 interagissent, nous avons réalisé une expérience de ligation par proximité (PLA) après 4h ou 1 jour d'activation *in vitro* de T CD8 WT. Nos résultats indiquent une forte proximité entre NLRP3 et le TGF β R1, représentée par les spots verts présents à 4 et 24h (figure 13e). De plus, nous avons montré par immunofluorescence que la phosphorylation de SMAD3 était diminuée dans les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} traités par TGF- β , par rapport aux T CD8 WT (figure 13f). La quantification de la MFI de pSMAD3 est présentée en annexe 2.

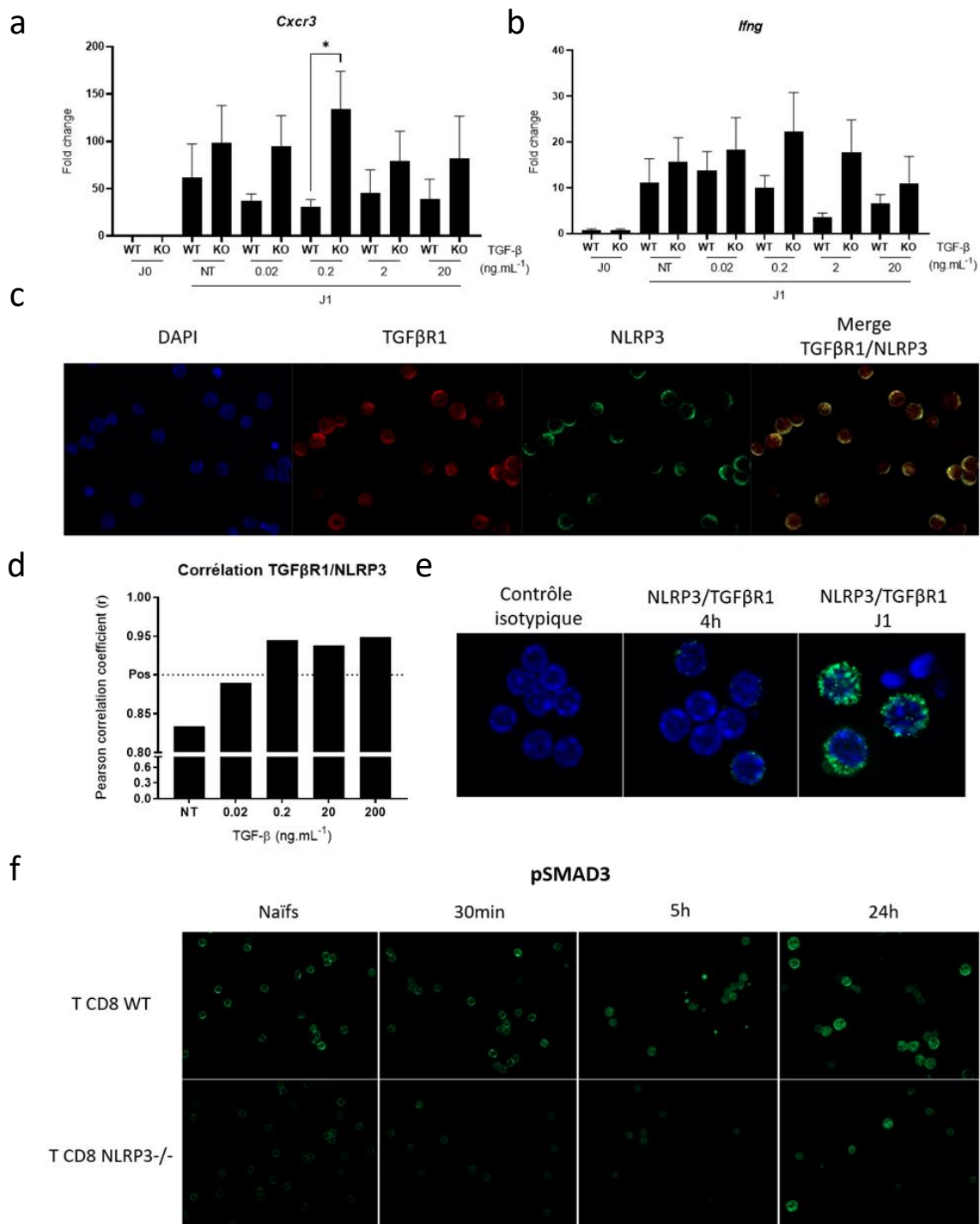


Figure 13 : NLRP3 participe à la signalisation du TGF-β. Analyse par RT-qPCR de l'expression de *Cxcr3* (a) et *Ifng* (b) après 1 jour de stimulation *in vitro* par anticorps anti-CD3 et CD28 des T CD8 WT ou NLRP3^{-/-}. Les cellules ont été traitées par une dose croissante de TGF-β (n=3). Analyse de la colocalisation (jaune) de NLRP3 (vert) et du récepteur au TGF-β (rouge) par immunofluorescence (c) de T CD8 traités par 2ng.mL⁻¹ de TGF-β. La probabilité de colocalisation a été quantifiée par coefficient de Pearson grâce au logiciel d'analyse d'image Icy (d). Analyse de la proximité de NLRP3 et du TGFβR1 dans des T CD8 WT après un jour de stimulation *in vitro*, par expérience de liaison par proximité (e). La forte proximité des deux protéines (<40nm) est représentée par des points verts sur l'image. Analyse par immunofluorescence de la cinétique de phosphorylation de SMAD3 dans des T CD8 WT ou *Nlrp3*^{-/-} traités par 2ng.mL⁻¹ de TGF-β (f). La significativité statistique a été évaluée par des tests de Mann-Withney (a et b), *p<0.05, n=3.

En accord avec les données de single-cell RNA-seq obtenues *in vivo*, nous avons étudié le profil de différenciation des T CD8 *Nlrp3*^{-/-}. Pour cela, nous avons trié sur la base des antigènes membranaires CD62L et CD44 les T CD8 de souris sauvages ou CD8 *Nlrp3*^{-/-}. Nos résultats indiquent que les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} triés avant activation *in vitro* ont une expression accrue de CD44, leur conférant un phénotype de « cellules effectrices mémoires » CD44⁺CD62L⁻ (figure 14a). Les proportions des différents phénotypes de T CD8 totaux présents dans les souris WT ou T CD8 *Nlrp3*^{-/-} sont présentées en figure 14b.

Enfin, Gunderson *et al.*, 2020, ont montré que les T CD8 déficients pour ALK5, la kinase à la base du TGFβR1, ont une sensibilité accrue à la stimulation par le TCR. Afin d'étudier la sensibilité du TCR des T CD8, nous avons activé *in vitro* les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} et leurs contrôles pendant 1 jour, en présence d'une concentration stable d'anti-CD28, mais croissante d'anticorps anti-CD3. Par la suite, nous avons réalisé un marquage intracellulaire de l'IFN-γ. Nos résultats montrent que les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} sont capables de former plus rapidement des clusters, signes d'activation *in vitro* (figure 14c). De plus, ils sont capables de produire plus d'IFN-γ à des concentrations d'anti-CD3 plus faibles, par rapport aux T CD8 WT (figure 14d).

La caractérisation de l'activation et de la différenciation des T CD8 *Nlrp3*^{-/-} est en cours. Cependant, ensemble, ces résultats indiquent que les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} possèdent un phénotype effecteur (regroupant les capacités inflammatoires, migratoires et de réactivité face à l'activation du TCR) plus important que les cellules T CD8 WT.

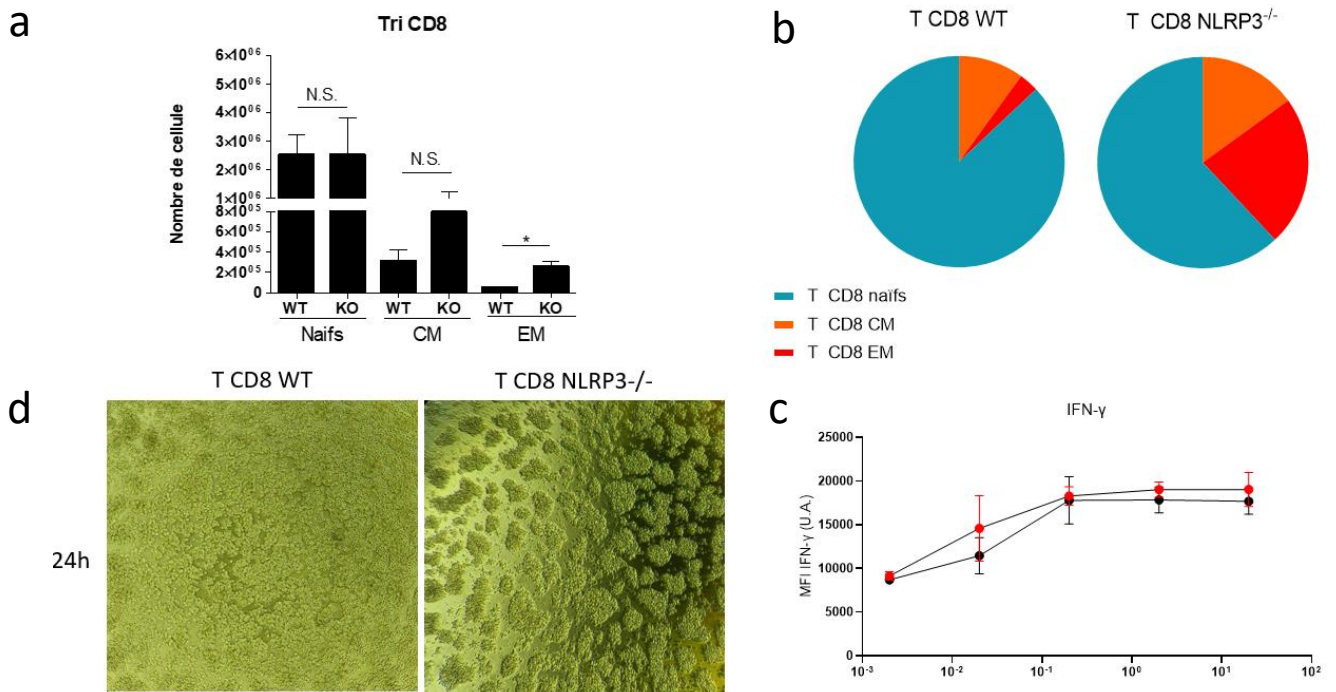


Figure 14 : L'activation des T CD8 *Nlrp3*^{-/-} est accrue. Analyse des populations de T CD8 présentes chez des souris WT ou T CD8 *Nlrp3*^{-/-}. Les cellules ont été triées par cytométrie en flux, après extraction. Les T CD8 sont triés suivant l'expression de leurs antigènes membranaires, puis classés naïfs (CD62L⁺ CD44⁻) centraux mémoires (CD62L⁺ et CD44⁺) ou effecteurs mémoires (CD62L⁻ CD44⁺), la significativité statistique a été évaluée par des tests de Mann-Whitney, *p<0.05, n=4. Les proportions de ces trois sous-types sont représentées en (b). Analyse par microscopie optique des clusters de T CD8 WT ou *Nlrp3*^{-/-} après 24h de stimulation *in vitro* par des anticorps anti-CD3 et CD28 (d). Marquage intracellulaire par cytométrie en flux de l'IFN- γ de T CD8 WT ou *Nlrp3*^{-/-} activés *in vitro* par une dose croissante d'anticorps anti-CD3 et 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'anti-CD28 (c).

Discussion : Rôles indépendants de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes T

Les Th17 sont caractérisés par leur production d'IL-17 et l'expression du facteur de transcription ROR γ ^{105,106,376}. Le rôle des Th17 dans le cancer est encore ambigu, dépendant du site d'implantation des tumeurs, du microenvironnement tumoral et des cytokines influençant la différenciation des cellules. La présence de TGF- β induit des phénotypes immunosuppresseurs des cellules T, en particulier par l'expression d'ectonucléotidases CD39 et CD73 et le relargage d'adénosine^{377,378}. La surstimulation du TCR peut aussi être liée à un profil immunosuppresseur des Th17, à la suite de modifications épigénétiques conduisant à l'expression stable de FoxP3³⁷⁹. Dans le même temps, des Th17 différenciés sans TGF- β expriment T-bet et produisent de l'IFN- γ , favorisant un phénotype inflammatoire. Les Th17 ayant été découverts dans un contexte d'EAE par Cua *et al.*, (2003)¹⁸⁶, notre travail possède aussi un intérêt dans l'étude des maladies auto-immunes du système nerveux, où les Th17 inflammatoires jouent un rôle dans le développement et la sévérité de la maladie. Il a particulièrement été décrit que les Th17 qui acquièrent un profil inflammatoire avec la sécrétion d'IFN- γ aggravent les modèles d'EAE et induisent de la neuroinflammation en interagissant avec les astrocytes du cerveau^{380,381}. Ainsi, dans ce contexte, NLRP3 pourrait prévenir l'auto-immunité induite par les Th17 inflammatoires.

Dans nos expériences, nous avons montré que les Th17 déficients pour NLRP3 et différenciés *in vitro* en présence de TGF- β possèdent un transcriptome proche des Th17 inflammatoires décrits dans la littérature par Hu *et al.*, (2017) ; Lee *et al.*, (2012) ou encore Ramesh *et al.*, (2014)³⁸²⁻³⁸⁴. Nous avons montré que ce phénotype est stable dans le temps et observable dans un contexte de croissance tumorale chez la souris.

Dans cette étude, nous avons démontré que NLRP3 possède un rôle indépendant de l'inflammasome dans les Th17 et qu'il est nécessaire pour la transdifférenciation des Th17 en Treg. En effet, NLRP3 interagit avec le récepteur du TGF- β et participe à la transduction du signal à travers la voie SMAD3. De plus, NLRP3 inhibe la production de cytokines inflammatoires conduisant non seulement à un phénotype immunosuppresseur, mais aussi à une transdifférenciation facilitée en T régulateurs. En utilisant des modèles de souris transgéniques, nous avons pu observer que cibler NLRP3 dans les cellules T CD4, et *a fortiori* dans les Th17, permet de réduire l'immunosuppression des T CD8 et d'améliorer leurs fonctions antitumorales.

Nos résultats ont confirmé que les Th17 sont une source majeure de Treg dans les tumeurs. L'identification de la transdifférenciation de Th17 au sein des tumeurs ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques, afin de limiter l'immunosuppression associée aux Treg. En effet, la réduction de la croissance tumorale apportée par les anticorps anti-CD25, qui déplètent préférentiellement les Treg, n'est plus observable dans les modèles de souris CD4 *Nlrp3*^{-/-}. De plus, plutôt que d'éliminer les Treg, cibler la transdifférenciation des Th17 sous l'effet du TGF- β en bloquant NLRP3 dans les T CD4 pourrait être une méthode afin de diminuer conjointement la population de Treg et d'améliorer la production d'IFN- γ par les Th17. Même si le rôle de NLRP3 est toujours assez controversé, il a déjà été décrit par Ding *et al.*, 2022 et

Van Deventer *et al.*, 2010, qu'il pouvait restreindre l'immunité antitumorale. Une étude récente a montré par exemple que l'inhibition pharmacologique de NLRP3 peut bloquer le recrutement de cellules myéloïdes suppressives et améliorer l'efficacité d'immunothérapies à base d'anti-PD1³⁷⁰. NLRP3 semble avoir un intérêt thérapeutique, mais jusque-là, seules ses fonctions dans l'inflammasome ont été ciblées, en sachant que les inhibiteurs de l'inflammasome ne semblent pas affecter les fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3. Enfin, certaines données pré-cliniques ont montré le potentiel des thérapies de transfert adoptif de cellules T CD4 afin d'améliorer l'immunité antitumorale^{385,386}. Dans ce contexte, le transfert de Th17 n'a eu aucun effet, contrairement à celui des Th17 CD4 *Nlrp3*^{-/-}, qui a montré un potentiel antitumoral en activant les cellules T CD8.

En somme, nous avons montré que l'interaction entre NLRP3 et le récepteur au TGF- β facilite la phosphorylation de SMAD3 et l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires chez les Th17. NLRP3 joue un rôle important dans la transdifférenciation des Th17 en Treg et apparaît, grâce à cette fonction, comme une nouvelle cible thérapeutique visant à éliminer les Treg et réactiver l'immunité au sein des tumeurs.

Les T CD8 sont caractérisés par leur profil inflammatoire et cytotoxique, leur permettant d'éliminer les cellules tumorales. L'infiltration des tumeurs par les T CD8 est connue comme étant systématiquement de bon pronostic chez les patients. Malheureusement, il existe de nombreux paramètres les empêchant de remplir pleinement leur rôle. La composition du microenvironnement tumoral est très importante pour comprendre le recrutement et l'épuisement des cellules T CD8 au cours du temps³⁸⁷.

Il a été décrit que NLRP3 peut participer à l'activation des T CD8, à travers la sécrétion d'IL-1 β dans les cellules myéloïdes, notamment dans des contextes tumoraux ou infectieux³⁸⁸⁻³⁹⁰. Malgré tout, ces effets sont fortement reliés à l'impact indirect de l'IL-1 β sur les T CD8, en activant d'autres sous-types de cellules immunitaires, comme les cellules dendritiques, qui activent ensuite les T CD8³⁹¹⁻³⁹⁴. L'expression du récepteur à l'IL-1 β à la surface des T CD8 n'est pas clairement établie et n'a réussi à être mise en évidence que dans une petite proportion de T CD8 spécifiques de certains virus³⁹⁵. Dans notre étude, les traitements *in vitro* par l'IL-1 β , basés sur les concentrations d'IL-1 β présentes dans les surnageants de tumeur, ne semblent pas posséder d'effets directs sur les T CD8. De plus, notre modèle de souris CD8^{cre} *Nlrp3*^{flox} cible le promoteur E8I du gène codant *CD8a*, exprimé par les T CD8 mais dont certaines sous-régions ne sont pas impliquées dans la sélection thymique des cellules T CD4 ou dans l'expression de *CD8a* par les cellules dendritiques³⁹⁶. Ce modèle nous permet une délétion du gène codant pour *Nlrp3* spécifique des cellules T CD8. Ensemble, ces résultats nous ont conduit à penser que l'IL-1 β n'est pas impliquée dans le rôle de NLRP3 dans les T CD8.

Nous avons montré que NLRP3 est exprimé dans les T CD8 murins au cours de leur activation. Il existe peu de données concernant l'expression de NLRP3 dans les T CD8, murins ou humains. Arbore *et al.*, 2016, puis 2018, ont montré que NLRP3 est exprimé respectivement dans les T CD4 et les T CD8 humains. Dans les T CD4, l'inflammasome semble important dans leur activation, à travers une voie non canonique des protéines du complément, impliquant une

stimulation par CD46. Cette stimulation entraîne l'activation de NLRP3 par C5aR1 et la sécrétion d'IL-1 β par une boucle de rétrocontrôle positif autocrine sur les T CD4, drivant la différenciation en Th1 inflammatoires. Dans les T CD8, la stimulation du TCR et de CD46 activent aussi la sécrétion d'IFN- γ , mais les auteurs ont échoué à établir un lien entre les protéines du complément et l'inflammasome, ni à établir la sécrétion d'IL-1 β par les T CD8. Néanmoins, au cours de leurs expériences, ils ont montré que NLRP3 transloque dans le noyau des T CD8 humains, laissant supposer un rôle nucléaire. Dans les T CD8 murins, bien que n'ayant pas exploré ses fonctions nucléaires, nous avons montré que NLRP3 transloque aussi dans les T CD8, à l'instar des Th2 murins³¹¹.

Les cellules B16K1 expriment le CMH I de manière stable, les rendant pertinentes pour l'étude de la réponse T CD8 (Bertrand *et al.*, 2015)³⁹⁷. À l'inverse, les tumeurs dérivées de cellules LLC1 sont très peu infiltrées et ne répondent pas aux inhibiteurs de point de contrôle (Gianni *et al.*, 2021)³⁹⁸. Les résultats que nous avons obtenus confirment ces données, l'effet antitumoral des T CD8 *Nlrp3*^{-/-} étant plus important dans les deux modèles de tumeurs chaudes, infiltrées par les T CD8 (comme MC38 et B16K1) que dans les modèles plus froids comme B16F10 ou LLC1, dont le statut de NLRP3 dans les T CD8 n'altère que peu ou pas la croissance. L'étude des infiltrats et de leurs modulations sont en cours dans ces modèles.

Le TGF- β est une cytokine importante du microenvironnement tumoral. Sécrétée par les cellules tumorales ou les cellules immunitaires suppressives, ses rôles ne sont en revanche pas toujours clairs. D'une part, il permet d'induire l'expression de CD103 sur les T CD8 et de les différencier en T CD8 résidents mémoires antitumoraux, sécréteurs de granzyme B et d'IFN- γ ^{163,399}. D'autre part, la stimulation chronique des cellules par le TGF- β participe à l'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire. Il diminue le pouvoir effecteur des T CD8 (voire les transforme en T CD8 « régulateurs »), leur infiltration et il est associé à une diminution de la réponse aux immunothérapies. La voie des SMAD, notamment SMAD2, 3 et 4 transduit le signal du récepteur au TGF- β et conditionne l'immunosuppression des T CD8 naïfs et/ou résident mémoires⁴⁰⁰⁻⁴⁰⁵.

Il existe beaucoup de données dans la littérature précédemment citées concernant le lien entre NLRP3 et TGF- β , notamment à travers l'induction de ROS ou du processus de fibrose. Pour la première fois, nos travaux ont relié directement la voie du TGF- β et NLRP3. D'une part dans l'induction du profil immunosuppresseur des Th17 différenciés en présence de TGF- β et d'autre part dans les T CD8, où la déficience en NLRP3 évite l'inhibition de CXCR3 et de l'IFN- γ .

Dans les Th17 déficients pour NLRP3, le TGF- β n'induit plus la phosphorylation de SMAD3, diminuant l'expression de FoxP3 et la transdifférenciation en Treg classiques. Ces données sont en lien avec la littérature qui a montré depuis plusieurs années déjà que SMAD3, en coopération avec NFAT, est un inducteur de FoxP3⁴⁰⁶.

Dans les T CD8, nous avons montré que les T CD8 sont principalement plus activés et plus nombreux dans les tumeurs. Dans les T CD4 l'expression de la kinase associée au récepteur 1

au TGF- β d'ALK5 est régulée par la force du signal TCR (Tu *et al.*, 2018)⁴⁰⁷. Gunderson *et al.*, 2020 ont montré que les T CD8 déficients pour ALK5 ont une sensibilité accrue au signal du TCR, augmentant leur prolifération et la sécrétion d'IFN- γ , lorsqu'ils sont stimulés par des quantités plus faibles d'anti-CD3, que leurs contrôles⁴⁰⁰.

Ces données nous conduisent à penser que les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} pourraient s'activer plus vite et plus *fortement in vitro* et *in vivo*, expliquant les ralentissements de la croissance des tumeurs dans les modèles CD8^{cre} NLRP3^{flox}, ainsi que l'augmentation des cytokines sécrétées *in vitro*.

CXCR3 est un récepteur aux chimiokines, exprimé à la surface des NK, des Th1 et des T CD8 activés. Il est induit par l'IFN- γ et se lie avec les chimiokines CXCL9, 10 et 11. Toujours Gunderson *et al.*, 2020, montrent que l'inhibition de la voie du TGF- β augmente l'expression de CXCR3. Ainsi, l'augmentation du recrutement des T CD8 que nous avons observé pourrait s'expliquer par l'absence d'inhibition de CXCR3 par le TGF- β , grâce à la déficience de NLRP3, nécessaire à la transduction du signal du récepteur au TGF- β . De plus, et bien que nous ne l'ayons pas exploré, nous avons montré que les T CD8 déficients pour NLRP3 ont une expression plus grande de CCR7. Il serait intéressant d'étudier la question de son rôle dans le recrutement des cellules T jusqu'au site tumoral. Shields *et al.*, (2010) et Choi *et al.*, (2020) ont montré que CCR7 est impliqué dans le recrutement des cellules T CD8 mémoires, et que les tumeurs sont capables de sécréter ses ligands, CCL19 et CCL21^{194,408}. De même, Hudson *et al.*, 2019 ont décrit dans Immunity que les T CD8 progéniteurs épuisés sont capables de migrer et ont un caractère de cellule souche, pouvant répondre à l'immunothérapie et proliférer à nouveau dans les tumeurs. Ces données sont en accord avec le Single Cell RNA-seq que nous avons réalisé, même si nous n'avons pas pu le démontrer *in vivo* pour le moment⁹⁵.

Les cellules CarT sont des lymphocytes T dont le TCR est transgénique. Ils sont sélectionnés pour être spécifiques des tumeurs et modifiés génétiquement pour posséder tous les co-sigaux d'activation directement intégrés dans leur TCR. Il existe à l'heure actuelle plusieurs grandes limitations à leur efficacité, dont l'une d'elle est le recrutement des cellules CarT au site tumoral²⁴⁴. Il a déjà été montré qu'associer CXCR6 (récepteur de CXCL16) ou modifier les récepteurs déjà présents des CarT augmentent leur recrutement et leur effet antitumoral dans un modèle de cancer pancréatique^{409,410}. Malheureusement, l'immunosuppression médiée notamment par le TGF- β et les Treg diminue rapidement la capacité des cellules circulantes à être recrutées efficacement. Les CarT dérivés de lymphocytes T (CD4 ou CD8) expriment fortement CXCR3. Il a été montré que l'association d'une chimiothérapie immunogène à l'injection de CarT est responsable du recrutement en deux temps de CarT positifs aux CXCR3 et augmente l'effet d'une thérapie anti-PD-1²⁴⁸. Ainsi, associer la délétion ou l'inhibition de NLRP3 à une thérapie cellulaire de type CarT semble pertinent, étant donné l'intérêt de NLRP3 dans le recrutement et l'activation des cellules T CD8 positives pour CXCR3. Etant donné que cibler la voie du TGF- β dans les tumeurs est déjà en cours d'étude, l'élucidation du rôle de NLRP3 dans cette voie initie potentiellement la découverte de nouveaux traitements ciblant les fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes T^{411,412}. Les fonctions indépendantes de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes Th17 et T CD8 sont résumées en figure 1 et 1 bis.

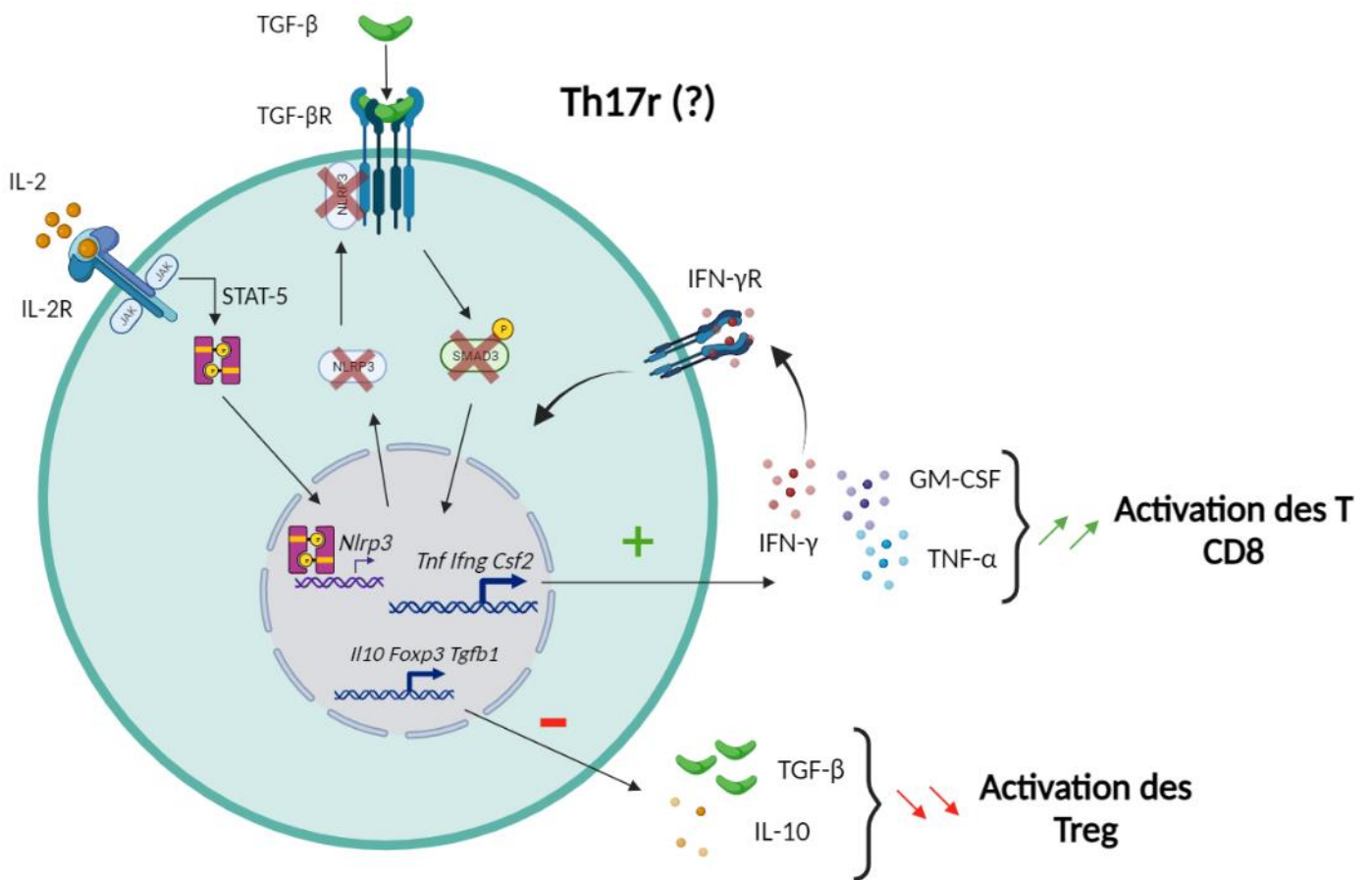


Figure 1 : Rôles indépendants de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes Th17. Après fixation de l'IL-2 sur son récepteur, la phosphorylation de STAT5 puis sa fixation sur le promoteur de NLRP3 induit son expression dans les populations de lymphocytes Th17. NLRP3 est ensuite capable d'interagir avec le récepteur du TGF-β et de transduire son signal à travers la phosphorylation de SMAD3. En l'absence de NLRP3, les gènes présents chez les Th17 inflammatoires sont exprimés, notamment les gènes codant pour l'IFN-γ ou le GM-CSF. Cette absence de suppression fragilise la différenciation des Th17 en Th17 régulateurs, qui ne sécrètent plus de cytokines immunosuppressives en réponse. L'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et la diminution des cytokines immunosuppressives à comme conséquences l'inhibition des Treg, et l'augmentation de l'activation des T CD8. Pour la première fois, notre travail met en lumière un rôle de NLRP3 dans la différenciation en cellules régulatrices des Th17, médiée par la voie du TGF-β.

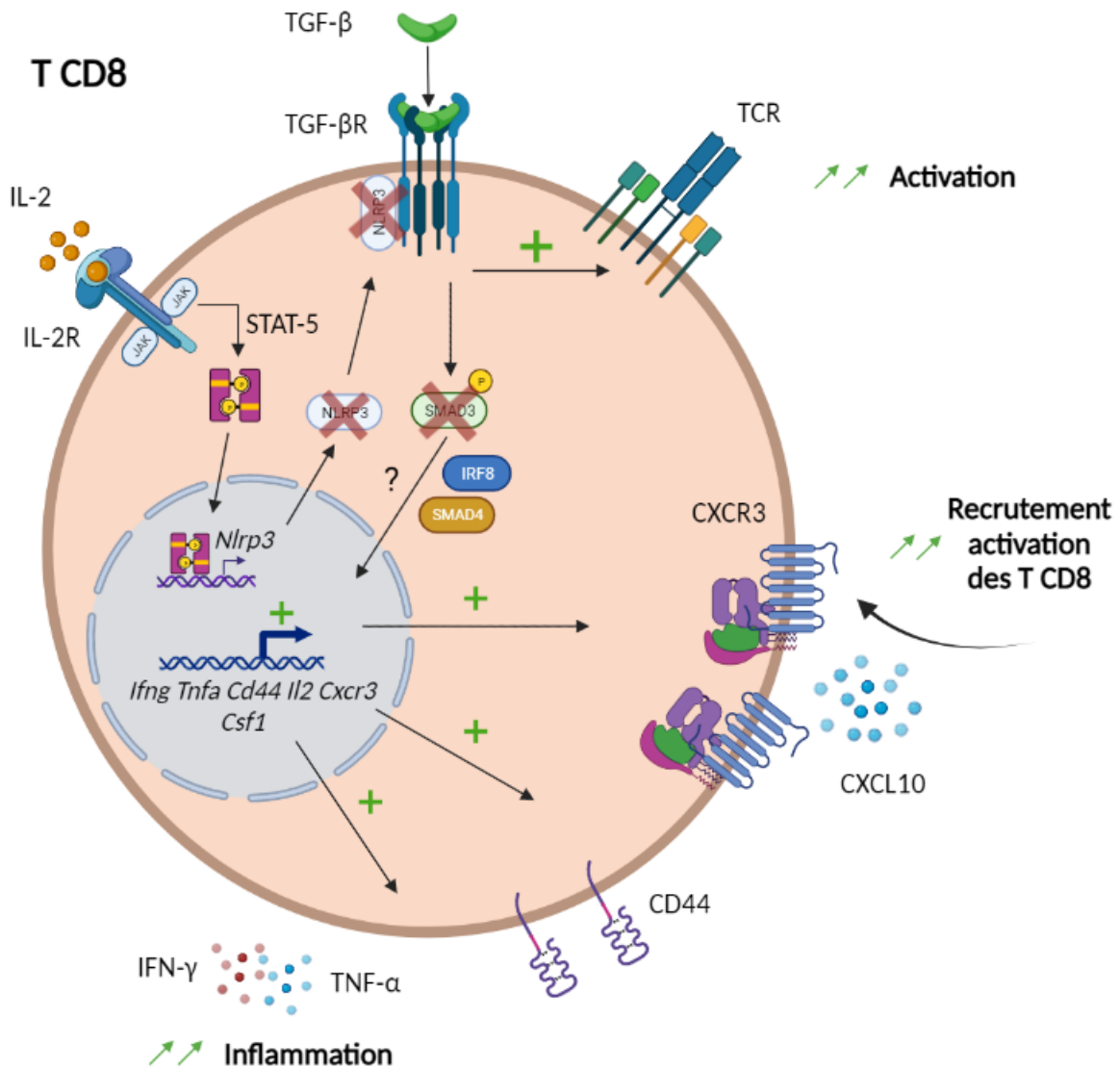


Figure 1 (bis) : Rôles indépendants de l'inflammasome de NLRP3 dans les lymphocytes T CD8. Après fixation de l'IL-2 sur son récepteur, la phosphorylation de STAT5 puis sa fixation sur le promoteur de NLRP3 induit son expression dans les populations de lymphocytes T CD8. NLRP3 est ensuite capable d'interagir avec le récepteur du TGF- β et de transduire son signal à travers la phosphorylation de SMAD3. Dans les T CD8, NLRP3 possède aussi un rôle immunosuppresseur. Son absence augmente leur activation en bloquant l'immunosuppression issue du TGF- β . Ainsi, dans les T CD8, l'absence de NLRP3 participe à la l'augmentation de la sécrétion d'IFN- γ et de l'expression de CXCR3 inhibé en temps normal par le TGF- β , augmentant leurs fonctions effectrices et leur capacité à être recrutés au site tumoral. Les T CD8 expriment aussi en plus grande quantité CD44. Pour la première fois, notre travail met en lumière un rôle de NLRP3 dans la voie immunosuppressive du TGF- β , dans les T CD8.

Références bibliographiques

1. Möller, G. & Möller, E. The concept of immunological surveillance against neoplasia. *Transplant. Rev.* **28**, 3–16 (1976).
2. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).
3. Lynch, H. T., Snyder, C. L., Shaw, T. G., Heinen, C. D. & Hitchins, M. P. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 181–194 (2015).
4. Sinicrope, F. A. Lynch Syndrome–Associated Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **379**, 764–773 (2018).
5. Li, G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **18**, 85–98 (2008).
6. Collura, A. *et al.* Instabilité des microsatellites et cancer - De l'instabilité du génome à la médecine personnalisée. *médecine/sciences* **35**, 535–543 (2019).
7. Jhunjunwala, S., Hammer, C. & Delamarre, L. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* **21**, 298–312 (2021).
8. Fumet, J.-D., Truntzer, C., Yarchoan, M. & Ghiringhelli, F. Tumour mutational burden as a biomarker for immunotherapy: Current data and emerging concepts. *Eur. J. Cancer* **131**, 40–50 (2020).
9. Yarchoan, M., Johnson, B. A., Lutz, E. R., Laheru, D. A. & Jaffee, E. M. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 209–222 (2017).
10. Zhu, Y., Qian, Y., Li, Z., Li, Y. & Li, B. Neoantigen-reactive T cell: An emerging role in adoptive cellular immunotherapy. *MedComm* **2**, 207–220 (2021).
11. McGrail, D. J. *et al.* High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann. Oncol.* **32**, 661–672 (2021).
12. Kanda, Y., Okazaki, T. & Katakai, T. Motility Dynamics of T Cells in Tumor-Draining Lymph Nodes: A Rational Indicator of Antitumor Response and Immune Checkpoint Blockade. *Cancers* **13**, 4616 (2021).
13. Balachandran, V. P. *et al.* Identification of unique neoantigen qualities in long term pancreatic cancer survivors. *Nature* **551**, 512–516 (2017).
14. Rosenthal, R. *et al.* Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature* **567**, 479–485 (2019).
15. Łuksza, M. *et al.* Neoantigen quality predicts immunoediting in survivors of pancreatic cancer. *Nature* **606**, 389–395 (2022).
16. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond. Engl.* **357**, 539–545 (2001).
17. Elinav, E. *et al.* Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 759–771 (2013).

18. Haabeth, O. A. W., Lorvik, K. B., Yagita, H., Bogen, B. & Corthay, A. Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells. *Oncoimmunology* **5**, e1039763 (2016).
19. Haabeth, O. A. W. *et al.* Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat. Commun.* **2**, 240 (2011).
20. Végran, F. *et al.* The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat. Immunol.* **15**, 758–766 (2014).
21. Lu, Y. *et al.* Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* **33**, 1048-1060.e7 (2018).
22. Xue, G., Jin, G., Fang, J. & Lu, Y. IL-4 together with IL-1 β induces antitumor Th9 cell differentiation in the absence of TGF- β signaling. *Nat. Commun.* **10**, 1376 (2019).
23. Canaria, D. A. *et al.* IL-1 β promotes IL-9-producing Th cell differentiation in IL-2-limiting conditions through the inhibition of BCL6. *Front. Immunol.* **13**, 1032618 (2022).
24. Bent, R., Moll, L., Grabbe, S. & Bros, M. Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies? *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2155 (2018).
25. Rébé, C. & Ghiringhelli, F. Interleukin-1 β and Cancer. *Cancers* **12**, 1791 (2020).
26. Chaudhry, S. I. *et al.* Autocrine IL-1 β -TRAF6 signalling promotes squamous cell carcinoma invasion through paracrine TNF α signalling to carcinoma-associated fibroblasts. *Oncogene* **32**, 747–758 (2013).
27. Kaler, P., Augenlicht, L. & Klampfer, L. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells; a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene* **28**, 3892–3902 (2009).
28. Hai Ping, P., Feng Bo, T., Li, L., Nan Hui, Y. & Hong, Z. IL-1 β /NF- κ b signaling promotes colorectal cancer cell growth through miR-181a/PTEN axis. *Arch. Biochem. Biophys.* **604**, 20–26 (2016).
29. Das, S., Shapiro, B., Vucic, E. A., Vogt, S. & Bar-Sagi, D. Tumor Cell-Derived IL1 β Promotes Desmoplasia and Immune Suppression in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* **80**, 1088–1101 (2020).
30. Hamilton, J. A. GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
31. Brosbøl-Ravnborg, A. *et al.* Toll-like receptor-induced granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion is impaired in Crohn's disease by nucleotide oligomerization domain 2-dependent and -independent pathways. *Clin. Exp. Immunol.* **155**, 487–495 (2009).
32. Kumar, A., Taghi Khani, A., Sanchez Ortiz, A. & Swaminathan, S. GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **13**, 901277 (2022).
33. Freeman, A. J., Kearney, C. J., Silke, J. & Oliaro, J. Unleashing TNF cytotoxicity to enhance cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* **42**, 1128–1142 (2021).
34. Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. & Goeddel, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845–853 (1993).
35. Wu, Y. & Zhou, B. P. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* **102**, 639–644 (2010).

36. Kearney, C. J. *et al.* Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. *Sci. Immunol.* **3**, eaar3451 (2018).
37. GEINDREAU, M., BRUCHARD, M. & VEGAN, F. Role of Cytokines and Chemokines in Angiogenesis in a Tumor Context. *Cancers* **14**, 2446 (2022).
38. Charles, K. A. *et al.* The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 3011–3023 (2009).
39. Montfort, A. *et al.* The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
40. Kotredes, K. P. & Gamero, A. M. Interferons as Inducers of Apoptosis in Malignant Cells. *J. Interferon Cytokine Res.* **33**, 162–170 (2013).
41. Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. & Zhang, Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark. Res.* **8**, 49 (2020).
42. Alspach, E., Lussier, D. M. & Schreiber, R. D. Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, a028480 (2019).
43. Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N. & Frazer, I. H. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis.* **8**, e2836 (2017).
44. Overacre-Delgoffe, A. E. *et al.* Interferon- γ Drives Treg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell* **169**, 1130-1141.e11 (2017).
45. Gocher, A. M., Workman, C. J. & Vignali, D. A. A. Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 158–172 (2022).
46. Mimura, K. *et al.* PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Sci.* **109**, 43–53 (2018).
47. Imaizumi, T. *et al.* Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 486–491 (2002).
48. Accogli, T., Bruchard, M. & Végran, F. Modulation of CD4 T Cell Response According to Tumor Cytokine Microenvironment. *Cancers* **13**, 373 (2021).
49. Bruni, D., Angell, H. K. & Galon, J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 662–680 (2020).
50. Hughes, C. E. & Nibbs, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. *Febs J.* **285**, 2944–2971 (2018).
51. Ménétrier-Caux, C., Gobert, M. & Caux, C. Differences in Tumor Regulatory T-Cell Localization and Activation Status Impact Patient Outcome. *Cancer Res.* **69**, 7895–7898 (2009).
52. Tan, M. C. B. *et al.* Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 1746–1755 (2009).
53. Deng, G. Tumor-infiltrating regulatory T cells: origins and features. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* **7**, 81–87 (2018).

54. Guo, F., Iclozan, C., Suh, W.-K., Anasetti, C. & Yu, X.-Z. CD28 Controls Differentiation of Regulatory T Cells from Naive CD4 T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 2285–2291 (2008).
55. Horwitz, D. A., Zheng, S. G., Wang, J. & Gray, J. D. Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *Eur. J. Immunol.* **38**, 912–915 (2008).
56. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
57. Ouyang, W. *et al.* Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **11**, 618–627 (2010).
58. Won, H. Y., Shin, J. H., Oh, S., Jeong, H. & Hwang, E. S. Enhanced CD25+Foxp3+ regulatory T cell development by amodiaquine through activation of nuclear receptor 4A. *Sci. Rep.* **7**, 16946 (2017).
59. Hwang, J. Y. *et al.* Dissociating STAT4 and STAT5 Signaling Inhibitory Functions of SOCS3: Effects on CD8 T Cell Responses. *ImmunoHorizons* **3**, 547–558 (2019).
60. Marson, A. *et al.* Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* **445**, 931–935 (2007).
61. Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C. & Stagg, J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.* **276**, 121–144 (2017).
62. Zhang, M. *et al.* CXCL12 enhances angiogenesis through CXCR7 activation in human umbilical vein endothelial cells. *Sci. Rep.* **7**, 8289 (2017).
63. Vijayan, D., Young, A., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 709–724 (2017).
64. Hu, X. *et al.* IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* **24**, 563–574 (2006).
65. Mittal, S. K. & Roche, P. A. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr. Opin. Immunol.* **34**, 22–27 (2015).
66. Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S. & Medzhitov, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* **356**, 513–519 (2017).
67. Chen, J. *et al.* Strong adhesion by regulatory T cells induces dendritic cell cytoskeletal polarization and contact-dependent lethargy. *J. Exp. Med.* **214**, 327–338 (2017).
68. Gordon, K. J. & Blobel, G. C. Role of transforming growth factor-β superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1782**, 197–228 (2008).
69. Thomas, G. J., Hart, I. R., Speight, P. M. & Marshall, J. F. Binding of TGF-β1 latency-associated peptide (LAP) to αβ6 integrin modulates behaviour of squamous carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **87**, 859–867 (2002).
70. Lainé, A. *et al.* Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin αβ8-mediated TGF-β activation. *Nat. Commun.* **12**, 6228 (2021).
71. Robertson, I. B. & Rifkin, D. B. Regulation of the Bioavailability of TGF-β and TGF-β-Related Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a021907 (2016).

72. Vander Ark, A., Cao, J. & Li, X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell. Signal.* **52**, 112–120 (2018).
73. Hata, A. & Chen, Y.-G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a022061 (2016).
74. Derynck, R. & Budi, E. H. Specificity, versatility and control of TGF- β family signaling. *Sci. Signal.* **12**, eaav5183 (2019).
75. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
76. Zhang, Y. E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a022129 (2017).
77. Bernard, A. *et al.* The Tumor Microenvironment Impairs Th1 IFN γ Secretion through Alternative Splicing Modifications of Irf1 Pre-mRNA. *Cancer Immunol. Res.* **9**, 324–336 (2021).
78. Worthington, J. J. *et al.* Integrin $\alpha\beta 8$ -Mediated TGF- β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* **42**, 903–915 (2015).
79. Edwards, J. P. *et al.* The GARP/Latent TGF- $\beta 1$ complex on Treg cells modulates the induction of peripherally derived Treg cells during oral tolerance. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1480–1489 (2016).
80. Holmgaard, R. B. *et al.* Tumor-expressed IDO recruits and activates MDSCs in a Treg-dependent manner. *Cell Rep.* **13**, 412–424 (2015).
81. Huai, W. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates NLRP3 inflammasome activity by inhibiting NLRP3 transcription. *Nat. Commun.* **5**, 4738 (2014).
82. Peyraud, F. *et al.* Targeting Tryptophan Catabolism in Cancer Immunotherapy Era: Challenges and Perspectives. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
83. Gutiérrez-Vázquez, C. & Quintana, F. J. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* **48**, 19–33 (2018).
84. Moon, Y. W., Hajjar, J., Hwu, P. & Naing, A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J. Immunother. Cancer* **3**, 51 (2015).
85. Yu, Y. *et al.* Recent advances in CD8+ regulatory T cell research. *Oncol. Lett.* **15**, 8187–8194 (2018).
86. Levescot, A. & Cerf-Bensussan, N. Regulatory CD8+ T cells suppress disease. *Science* **376**, 243–244 (2022).
87. Zappasodi, R. *et al.* CTLA-4 blockade drives loss of Treg stability in glycolysis-low tumours. *Nature* **591**, 652–658 (2021).
88. Beyersdorf, N., Kerkau, T. & Hünig, T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *ImmunoTargets Ther.* **4**, 111–122 (2015).
89. Beckermann, K. E. *et al.* CD28 costimulation drives tumor-infiltrating T cell glycolysis to promote inflammation. *JCI Insight* **5**, e138729.

90. Boussiotis, V. A. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1767–1778 (2016).
91. Jin, H.-T. *et al.* Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14733–14738 (2010).
92. Solinas, C., De Silva, P., Bron, D., Willard-Gallo, K. & Sangiolo, D. Significance of TIM3 expression in cancer: From biology to the clinic. *Semin. Oncol.* **46**, 372–379 (2019).
93. de Mingo Pulido, Á. *et al.* The inhibitory receptor TIM-3 limits activation of the cGAS-STING pathway in intra-tumoral dendritic cells by suppressing extracellular DNA uptake. *Immunity* **54**, 1154-1167.e7 (2021).
94. Kang, C.-W. *et al.* Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3+CD8+ T cells in colon cancer. *Sci. Rep.* **5**, 15659 (2015).
95. Hudson, W. H. *et al.* Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1+ Stem-like CD8+ T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **51**, 1043-1058.e4 (2019).
96. Yang, R. *et al.* Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat. Commun.* **12**, 832 (2021).
97. Casrouge, A. *et al.* Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 5782–5787 (2000).
98. Rossy, J., Williamson, D. & Gaus, K. How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
99. Courtney, A. H. *et al.* CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. *Sci. Signal.* **12**, eaaw8151 (2019).
100. Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J. & Kazi, J. U. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 412 (2021).
101. Park, S.-G. *et al.* Phosphoinositide-dependent kinase 1 integrates T cell receptor and CD28 co-receptor signaling to effect NF- κ B induction and T cell activation. *Nat. Immunol.* **10**, 158–166 (2009).
102. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **136**, 2348–2357 (1986).
103. Krakowski, M. & Owens, T. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1641–1646 (1996).
104. Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744–748 (2003).
105. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–1132 (2005).
106. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6**, 1133–1141 (2005).

107. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121–1133 (2006).
108. Mathur, A. N. *et al.* Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 4901–4907 (2007).
109. Laurence, A. *et al.* STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease. *Immunity* **37**, 209–222 (2012).
110. Jain, R. *et al.* Interleukin-23-Induced Transcription Factor Blimp-1 Promotes Pathogenicity of T Helper 17 Cells. *Immunity* **44**, 131–142 (2016).
111. Mailer, R. K. W. *et al.* IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Sci. Rep.* **5**, 14674 (2015).
112. Ivanov, I. I. *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485–498 (2009).
113. Shih, V. F.-S. *et al.* Homeostatic IL-23 receptor signaling limits Th17 response through IL-22-mediated containment of commensal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13942–13947 (2014).
114. Miossec, P. & Kolls, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 763–776 (2012).
115. Lee, J.-Y. *et al.* Serum Amyloid A Proteins Induce Pathogenic TH17 Cells and Promote Inflammatory Disease. *Cell* **180**, 79-91.e16 (2020).
116. Sandquist, I. & Kolls, J. Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Research* **7**, 205 (2018).
117. Ramanan, D. *et al.* An Immunologic Mode of Multigenerational Transmission Governs a Gut Treg Setpoint. *Cell* **181**, 1276-1290.e13 (2020).
118. Zhou, L. *et al.* IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* **8**, 967–974 (2007).
119. Zhang, S. *et al.* Reversing SKI-SMAD4-mediated suppression is essential for TH17 cell differentiation. *Nature* **551**, 105–109 (2017).
120. Fielding, C. A. *et al.* Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity* **40**, 40–50 (2014).
121. Mukasa, R. *et al.* Epigenetic Instability of Cytokine and Transcription Factor Gene Loci Underlies Plasticity of the T Helper 17 Cell Lineage. *Immunity* **32**, 616–627 (2010).
122. Lee, Y. K. *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* **30**, 92–107 (2009).
123. Hirota, K. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.* **12**, 255–263 (2011).
124. Basu, R. *et al.* IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance. *Nat. Immunol.* **16**, 286–295 (2015).

125. Santarlasci, V. *et al.* TGF- β indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 207–215 (2009).
126. Martinez, G. J. *et al.* Smad3 Differentially Regulates the Induction of Regulatory and Inflammatory T Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* **284**, 35283–35286 (2009).
127. Tanaka, S. *et al.* Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. *J. Exp. Med.* **215**, 1853–1868 (2018).
128. Yoon, J.-H. *et al.* Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nat. Commun.* **6**, 7600 (2015).
129. McGeachy, M. J. *et al.* TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* **8**, 1390–1397 (2007).
130. Rizzo, A. *et al.* Smad7 induces plasticity in tumor-infiltrating Th17 cells and enables TNF-alpha-mediated killing of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **35**, 1536–1546 (2014).
131. Ghoreschi, K. *et al.* Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* **467**, 967–971 (2010).
132. Chatterjee, S. *et al.* Reduced CD73 Expression by IL-1 β Programmed Th17 Cells Improves Tumor Control. *Cancer Res.* **74**, 6048–6059 (2014).
133. Brüstle, A. *et al.* The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat. Immunol.* **8**, 958–966 (2007).
134. Schraml, B. U. *et al.* The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* **460**, 405–409 (2009).
135. Ciofani, M. *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* **151**, 289–303 (2012).
136. Pham, D. *et al.* Batf Pioneers the Reorganization of Chromatin in Developing Effector T Cells via Ets1-Dependent Recruitment of Ctf. *Cell Rep.* **29**, 1203-1220.e7 (2019).
137. Zhang, F., Meng, G. & Strober, W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1297–1306 (2008).
138. Wang, C. *et al.* CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* **163**, 1413–1427 (2015).
139. Qiu, R. *et al.* Inhibition of Glycolysis in Pathogenic TH17 Cells through Targeting a miR -21-Peli1-c-Rel Pathway Prevents Autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **204**, 3160–3170 (2020).
140. Oo, Y. H. *et al.* CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *J. Hepatol.* **57**, 1044–1051 (2012).
141. van Hamburg, J. P. & Tas, S. W. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **87**, 69–81 (2018).
142. Fabre, J. *et al.* Targeting the Tumor Microenvironment: The Protumor Effects of IL-17 Related to Cancer Type. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1433 (2016).

143. Tosolini, M. *et al.* Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **71**, 1263–1271 (2011).
144. Liu, J. *et al.* IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **407**, 348–354 (2011).
145. Chen, X. *et al.* Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* **69**, 348–354 (2010).
146. Zhang, J.-P. *et al.* Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J. Hepatol.* **50**, 980–989 (2009).
147. Chen, J. *et al.* Intratumoral Expression of IL-17 and Its Prognostic Role in Gastric Adenocarcinoma Patients. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 53–60 (2011).
148. Kryczek, I. *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* **114**, 1141–1149 (2009).
149. Qian, X. *et al.* Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine* **89**, 34–44 (2017).
150. Seder, R. A. & Ahmed, R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat. Immunol.* **4**, 835–842 (2003).
151. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **402**, 34–38 (1999).
152. Kalia, V. & Sarkar, S. Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2—A Balancing Act. *Front. Immunol.* **9**, 2987 (2018).
153. Boyman, O. & Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 180–190 (2012).
154. Pipkin, M. E. *et al.* Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* **32**, 79–90 (2010).
155. Ahmed, R., Bevan, M. J., Reiner, S. L. & Fearon, D. T. The precursors of memory: models and controversies. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 662–668 (2009).
156. Chang, J. T., Wherry, E. J. & Goldrath, A. W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **15**, 1104–1115 (2014).
157. Borsa, M. *et al.* Asymmetric cell division shapes naive and virtual memory T-cell immunity during ageing. *Nat. Commun.* **12**, 2715 (2021).
158. Pollizzi, K. N. *et al.* Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8+ T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **17**, 704–711 (2016).
159. Ma, E. H. *et al.* Metabolic Profiling Using Stable Isotope Tracing Reveals Distinct Patterns of Glucose Utilization by Physiologically Activated CD8+ T Cells. *Immunity* **51**, 856–870.e5 (2019).
160. Chen, Y., Zander, R., Khatun, A., Schauder, D. M. & Cui, W. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation. *Front. Immunol.* **9**, 2826 (2018).

161. Yao, S. *et al.* Interferon regulatory factor 4 sustains CD8+ T cell expansion and effector differentiation. *Immunity* **39**, 10.1016/j.immuni.2013.10.007 (2013).
162. Martin, M. D. & Badovinac, V. P. Defining Memory CD8 T Cell. *Front. Immunol.* **9**, 2692 (2018).
163. Amsen, D., van Gisbergen, K. P. J. M., Hombrink, P. & van Lier, R. A. W. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat. Immunol.* **19**, 538–546 (2018).
164. Sakatani, T. *et al.* IFN-Gamma Expression in the Tumor Microenvironment and CD8-Positive Tumor-Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in Urothelial Cancer Patients Receiving Pembrolizumab. *Cancers* **14**, 263 (2022).
165. Noti, L. *et al.* A combined spatial score of granzyme B and CD68 surpasses CD8 as an independent prognostic factor in TNM stage II colorectal cancer. *BMC Cancer* **22**, 987 (2022).
166. Ganesan, A.-P. *et al.* Tissue-resident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. *Nat. Immunol.* **18**, 940–950 (2017).
167. Djenidi, F. *et al.* CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 3475–3486 (2015).
168. Kok, L., Masopust, D. & Schumacher, T. N. The precursors of CD8+ tissue resident memory T cells: from lymphoid organs to infected tissues. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 283–293 (2022).
169. Bartolomé-Casado, R. *et al.* Resident memory CD8 T cells persist for years in human small intestine. *J. Exp. Med.* **216**, 2412–2426 (2019).
170. Law, R. H. P. *et al.* The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* **468**, 447–451 (2010).
171. Osińska, I., Popko, K. & Demkow, U. Perforin: an important player in immune response. *Cent.-Eur. J. Immunol.* **39**, 109–115 (2014).
172. Ou-Yang, C. *et al.* Role of LAT in the Granule-Mediated Cytotoxicity of CD8 T Cells. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2674–2684 (2012).
173. Krensky, A. M. & Clayberger, C. Biology and clinical relevance of granzysin. *Tissue Antigens* **73**, 193–198 (2009).
174. Stinchcombe, J. C. & Griffiths, G. M. Secretory Mechanisms in Cell-Mediated Cytotoxicity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 495–517 (2007).
175. Pardo, J. *et al.* Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J. Cell Biol.* **167**, 457–468 (2004).
176. Anthony, D. A., Andrews, D. M., Watt, S. V., Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation: Granzymes in apoptosis and inflammation. *Immunol. Rev.* **235**, 73–92 (2010).
177. Cullen, S. P., Brunet, M. & Martin, S. J. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ.* **17**, 616–623 (2010).

178. Chowdhury, D. *et al.* The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol. Cell* **23**, 133–142 (2006).
179. Hirst, C. E. *et al.* The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 805–815 (2003).
180. Sun, B., Liu, M., Cui, M. & Li, T. Granzyme B-expressing treg cells are enriched in colorectal cancer and present the potential to eliminate autologous T conventional cells. *Immunol. Lett.* **217**, 7–14 (2020).
181. Zhao, D.-M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J. & Shevach, E. M. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* **107**, 3925–3932 (2006).
182. Micheau, O. & Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**, 181–190 (2003).
183. Vredevoogd, D. W. *et al.* Augmenting Immunotherapy Impact by Lowering Tumor TNF Cytotoxicity Threshold. *Cell* **178**, 585-599.e15 (2019).
184. Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G. J., de Jong, S. & Kruyt, F. a. E. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ.* **20**, 858–868 (2013).
185. Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Kudo, Y. & Ishimaru, N. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
186. Montinaro, A. & Walczak, H. Harnessing TRAIL-induced cell death for cancer therapy: a long walk with thrilling discoveries. *Cell Death Differ.* **30**, 237–249 (2023).
187. Whitmire, J. K., Tan, J. T. & Whitton, J. L. Interferon- γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J. Exp. Med.* **201**, 1053–1059 (2005).
188. Teixeira, L. K. *et al.* IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 5931–5939 (2005).
189. Hatton, R. D. *et al.* A distal conserved sequence element controls Ifng gene expression by T cells and NK cells. *Immunity* **25**, 717–729 (2006).
190. Vacaflares, A., Freedman, S. N., Chapman, N. M. & Houtman, J. C. D. Pretreatment of activated human CD8 T cells with IL-12 leads to enhanced TCR-induced signaling and cytokine production. *Mol. Immunol.* **81**, 1–15 (2017).
191. Zebley, C. C. *et al.* Proinflammatory cytokines promote TET2-mediated DNA demethylation during CD8 T cell effector differentiation. *Cell Rep.* **37**, 109796 (2021).
192. Suarez-Ramirez, J. E., Tarrio, M. L., Kim, K., Demers, D. A. & Biron, C. A. CD8 T Cells in Innate Immune Responses: Using STAT4-Dependent but Antigen-Independent Pathways to Gamma Interferon during Viral Infection. *mBio* **5**, e01978-14 (2014).
193. de Araújo-Souza, P. S. *et al.* Differential interferon- γ production by naive and memory-like CD8 T cells. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 1329–1337 (2020).

194. Choi, H., Song, H. & Jung, Y. W. The Roles of CCR7 for the Homing of Memory CD8+ T Cells into Their Survival Niches. *Immune Netw.* **20**, e20 (2020).
195. Mueller, S. N. *et al.* Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses. *Science* **317**, 670–674 (2007).
196. Shields, J. D. *et al.* Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling. *Cancer Cell* **11**, 526–538 (2007).
197. Russo, E., Santoni, A. & Bernardini, G. Tumor inhibition or tumor promotion? The duplicity of CXCR3 in cancer. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 673–685 (2020).
198. Mikucki, M. *et al.* Non-redundant Requirement for CXCR3 Signaling during Tumoricidal T Cell Trafficking across Tumor Vascular Checkpoints. *Nat. Commun.* **6**, 7458 (2015).
199. Nagarsheth, N., Wicha, M. S. & Zou, W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 559–572 (2017).
200. Zhang, M. *et al.* Prognostic Values of CD38+CD101+PD1+CD8+ T Cells in Pancreatic Cancer. *Immunol. Invest.* **48**, 466–479 (2019).
201. Bai, R., Lv, Z., Xu, D. & Cui, J. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomark. Res.* **8**, 34 (2020).
202. Zebley, C. C. & Youngblood, B. Mechanisms of T cell exhaustion guiding next-generation immunotherapy. *Trends Cancer* **8**, 726–734 (2022).
203. Jiang, T., Zhou, C. & Ren, S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **5**, e1163462 (2016).
204. Rosenberg, S. A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 5451–5458 (2014).
205. Panelli, M. C. *et al.* Forecasting the cytokine storm following systemic interleukin (IL)-2 administration. *J. Transl. Med.* **2**, 17 (2004).
206. Liu, J. *et al.* Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **15**, 28 (2022).
207. Ghiringhelli, F. WITHDRAWN: Nouvelles stratégies innovantes en immunothérapie. *Bull. Cancer (Paris)* S0007455118301140 (2018) doi:10.1016/j.bulcan.2018.03.004.
208. Garon, E. B. *et al.* Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2018–2028 (2015).
209. Brahmer, J. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–135 (2015).
210. Kaderbhai, C.-G. *et al.* Response to first line chemotherapy regimen is associated with efficacy of nivolumab in non-small-cell lung cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1339856 (2017).
211. Sahin, I. H. *et al.* Immune checkpoint inhibitors for the treatment of MSI-H/MMR-D colorectal cancer and a perspective on resistance mechanisms. *Br. J. Cancer* **121**, 809–818 (2019).

212. Banna, G. L. *et al.* Are anti-PD1 and anti-PD-L1 alike? The non-small-cell lung cancer paradigm. *Oncol. Rev.* **14**, 490 (2020).
213. Qiao, D.-R., Cheng, J.-Y., Yan, W.-Q. & Li, H.-J. PD-L1/PD-1 blockage enhanced the cytotoxicity of natural killer cell on the non-small cell lung cancer (NSCLC) by granzyme B secretion. *Clin. Transl. Oncol.* (2023) doi:10.1007/s12094-023-03120-w.
214. Goggi, J. L. *et al.* Granzyme B PET Imaging of Combined Chemotherapy and Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Colon Cancer. *Mol. Imaging Biol.* **23**, 714–723 (2021).
215. Yeong, J. *et al.* Prognostic value of CD8 + PD-1+ immune infiltrates and PDCD1 gene expression in triple negative breast cancer. *J. Immunother. Cancer* **7**, 34 (2019).
216. Tabanelli, V. *et al.* The identification of TCF1+ progenitor exhausted T cells in THRLBCL may predict a better response to PD-1/PD-L1 blockade. *Blood Adv.* **6**, 4634–4644 (2022).
217. Miller, B. C. *et al.* Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat. Immunol.* **20**, 326–336 (2019).
218. Khan, O. *et al.* TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature* **571**, 211–218 (2019).
219. Wei, S. C. *et al.* Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* **170**, 1120–1133.e17 (2017).
220. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
221. Govindan, R. *et al.* Phase III Trial of Ipilimumab Combined With Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **35**, 3449–3457 (2017).
222. Postow, M. A. *et al.* Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2006–2017 (2015).
223. Hellmann, M. D. *et al.* Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2020–2031 (2019).
224. Avery, L., Filderman, J., Szymczak-Workman, A. L. & Kane, L. P. Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 2455–2460 (2018).
225. Shayan, G. *et al.* Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer. *Oncoimmunology* **6**, (2017).
226. Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* **207**, 2187–2194 (2010).
227. Maçon-Lemaître, L. & Triebel, F. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. *Immunology* **115**, 170–178 (2005).
228. Chocarro, L. *et al.* Clinical landscape of LAG-3-targeted therapy. *Immuno-Oncol. Technol.* **14**, 100079 (2022).

229. Wang, Q. *et al.* Immunogenic cell death in anticancer chemotherapy and its impact on clinical studies. *Cancer Lett.* **438**, 17–23 (2018).
230. Gandhi, L. *et al.* Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2078–2092 (2018).
231. Bruchard, M. *et al.* Recruitment and activation of type 3 innate lymphoid cells promote antitumor immune responses. *Nat. Immunol.* **23**, 262–274 (2022).
232. Limagne, E. *et al.* MEK inhibition overcomes chemoimmunotherapy resistance by inducing CXCL10 in cancer cells. *Cancer Cell* **40**, 136–152.e12 (2022).
233. Tran, L. *et al.* Cisplatin Alters Antitumor Immunity and Synergizes with PD-1/PD-L1 Inhibition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 1141–1151 (2017).
234. Wang, L., Zhou, D., Ren, H. & Chen, Y. Effects of modified FOLFOX-6 chemotherapy on cellular immune function in patients with gastric cancer. *Oncol. Lett.* **15**, 8635–8640 (2018).
235. Zhang, X. *et al.* Low-Dose Gemcitabine Treatment Enhances Immunogenicity and Natural Killer Cell-Driven Tumor Immunity in Lung Cancer. *Front. Immunol.* **11**, 331 (2020).
236. Fu, B.-H. *et al.* Platelet VEGF and serum TGF- β 1 levels predict chemotherapy response in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **36**, 6477–6483 (2015).
237. Srivastava, S. & Riddell, S. R. Engineering CAR-T Cells: Design Concepts. *Trends Immunol.* **36**, 494–502 (2015).
238. Kowolik, C. M. *et al.* CD28 Costimulation Provided through a CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor Enhances In vivo Persistence and Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred T Cells. *Cancer Res.* **66**, 10995–11004 (2006).
239. Kershaw, M. H. *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 6106–6115 (2006).
240. Hollyman, D. *et al.* Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* **32**, 169–180 (2009).
241. Kochenderfer, J. N. *et al.* Construction and Pre-clinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* **32**, 689–702 (2009).
242. Kochenderfer, J. N. *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor–transduced T cells. *Blood* **119**, 2709–2720 (2012).
243. Kochenderfer, J. N. *et al.* Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J. Clin. Oncol.* **33**, 540–549 (2015).
244. Sterner, R. C. & Sterner, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* **11**, 1–11 (2021).

245. Brudno, J. N. & Kochenderfer, J. N. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* **127**, 3321–3330 (2016).
246. Brudno, J. N. *et al.* Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully-human binding domains in patients with B-cell lymphoma. *Nat. Med.* **26**, 270–280 (2020).
247. Rafiq, S., Hackett, C. S. & Brentjens, R. J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 147–167 (2020).
248. Srivastava, S. *et al.* Immunogenic Chemotherapy Enhances Recruitment of CAR-T Cells to Lung Tumors and Improves Antitumor Efficacy when Combined with Checkpoint Blockade. *Cancer Cell* **39**, 193–208.e10 (2021).
249. Di Stasi, A. *et al.* T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* **113**, 6392–6402 (2009).
250. Hochheiser, I. V. *et al.* Structure of the NLRP3 decamer bound to the cytokine release inhibitor CRID3. *Nature* **604**, 184–189 (2022).
251. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M. & Hoffmann, J. A. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* **86**, 973–983 (1996).
252. Qiao, Y., Wang, P., Qi, J., Zhang, L. & Gao, C. TLR-induced NF- κ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS Lett.* **586**, 1022–1026 (2012).
253. Xing, Y. *et al.* Cutting Edge: TRAF6 Mediates TLR/IL-1R Signaling–Induced Nontranscriptional Priming of the NLRP3 Inflammasome. *J. Immunol.* **199**, 1561–1566 (2017).
254. Xia, P. & Wadham, C. Sphingosine 1-phosphate, a key mediator of the cytokine network: Juxtacrine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 45–53 (2011).
255. McGeough, M. D. *et al.* TNF regulates transcription of NLRP3 inflammasome components and inflammatory molecules in cryopyrinopathies. *J. Clin. Invest.* **127**, 4488–4497 (2017).
256. Suhasini, M. & Pilz, R. B. Transcriptional elongation of *c-myc* is regulated by NF- κ B (p50/RelB). *Oncogene* **18**, 7360–7369 (1999).
257. Nakano, K., Uchamaru, K., Utsunomiya, A., Yamaguchi, K. & Watanabe, T. Dysregulation of *c-Myb* Pathway by Aberrant Expression of Proto-oncogene *MYB* Provides the Basis for Malignancy in Adult T-cell Leukemia/lymphoma Cells. *Clin. Cancer Res.* **22**, 5915–5928 (2016).
258. Bessede, A. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defense pathway. *Nature* **511**, 184–190 (2014).
259. Juliana, C. *et al.* Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 36617–36622 (2012).
260. Lin, K.-M. *et al.* IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 775–780 (2014).
261. Gurung, P. & Kanneganti, T.-D. Novel Roles for Caspase-8 in IL-1 β and Inflammasome Regulation. *Am. J. Pathol.* **185**, 17–25 (2015).

262. Song, N. *et al.* NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol. Cell* **68**, 185–197.e6 (2017).
263. Niu, T. *et al.* NLRP3 phosphorylation in its LRR domain critically regulates inflammasome assembly. *Nat. Commun.* **12**, 5862 (2021).
264. Py, B. F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H. & Yuan, J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. *Mol. Cell* **49**, 331–338 (2013).
265. Song, H. *et al.* The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nat. Commun.* **7**, 13727 (2016).
266. Yan, Y. *et al.* Dopamine Controls Systemic Inflammation through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *Cell* **160**, 62–73 (2015).
267. Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15**, 1170–1178 (2009).
268. Perregaux, D. & Gabel, C. A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 15195–15203 (1994).
269. Ferrari, D. *et al.* Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **159**, 1451–1458 (1997).
270. Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. & Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **47**, 15–31 (2017).
271. Katsnelson, M. A., Rucker, L. G., Russo, H. M. & Dubyak, G. R. K⁺ Efflux Agonists Induce NLRP3 Inflammasome Activation Independently of Ca²⁺ Signaling. *J. Immunol.* **194**, 3937–3952 (2015).
272. Di, A. *et al.* The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. *Immunity* **49**, 56–65.e4 (2018).
273. Lee, G.-S. *et al.* The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature* **492**, 123–127 (2012).
274. Rossol, M. *et al.* Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat. Commun.* **3**, 1329 (2012).
275. Jäger, E. *et al.* Calcium-sensing receptor-mediated NLRP3 inflammasome response to calcioprotein particles drives inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat. Commun.* **11**, 4243 (2020).
276. Rajamäki, K. *et al.* Extracellular Acidosis Is a Novel Danger Signal Alerting Innate Immunity via the NLRP3 Inflammasome. *J. Biol. Chem.* **288**, 13410–13419 (2013).
277. Wen, H. *et al.* Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* **12**, 408–415 (2011).
278. Karasawa, T. *et al.* Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 744–756 (2018).
279. Grebe, A., Hoss, F. & Latz, E. NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **122**, 1722–1740 (2018).

280. Quandt, D., Rothe, K., Baerwald, C. & Rossol, M. GPRC6A mediates Alum-induced Nlrp3 inflammasome activation but limits Th2 type antibody responses. *Sci. Rep.* **5**, 16719 (2015).
281. Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **9**, 847–856 (2008).
282. Chevriaux, A. *et al.* Cathepsin B Is Required for NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages, Through NLRP3 Interaction. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 167 (2020).
283. Braga, T. T. *et al.* Sensing soluble uric acid by Naip1-Nlrp3 platform. *Cell Death Dis.* **12**, 158 (2021).
284. Tschopp, J. & Schroder, K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 210–215 (2010).
285. Groß, C. J. *et al.* K⁺ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* **45**, 761–773 (2016).
286. Surabhi, S. *et al.* Hydrogen Peroxide Is Crucial for NLRP3 Inflammasome-Mediated IL-1 β Production and Cell Death in Pneumococcal Infections of Bronchial Epithelial Cells. *J. Innate Immun.* **14**, 192–206 (2022).
287. Erttmann, S. F. & Gekara, N. O. Hydrogen peroxide release by bacteria suppresses inflammasome-dependent innate immunity. *Nat. Commun.* **10**, 3493 (2019).
288. Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. & Tschopp, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* **11**, 136–140 (2010).
289. Ismael, S. *et al.* Thioredoxin interacting protein regulates age-associated neuroinflammation. *Neurobiol. Dis.* **156**, 105399 (2021).
290. Deo, P. *et al.* Mitochondrial dysfunction caused by outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria activates intrinsic apoptosis and inflammation. *Nat. Microbiol.* **5**, 1418–1427 (2020).
291. Park, S. *et al.* The Mitochondrial Antiviral Protein MAVS Associates with NLRP3 and Regulates Its Inflammasome Activity. *J. Immunol.* **191**, 4358–4366 (2013).
292. Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M. R., Wang, Z. & Germain, R. N. The Adaptor MAVS Promotes NLRP3 Mitochondrial Localization and Inflammasome Activation. *Cell* **153**, 348–361 (2013).
293. Agostini, L. *et al.* NALP3 Forms an IL-1 β -Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder. *Immunity* **20**, 319–325 (2004).
294. Misawa, T. *et al.* Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **14**, 454–460 (2013).
295. Li, X. *et al.* MARK4 regulates NLRP3 positioning and inflammasome activation through a microtubule-dependent mechanism. *Nat. Commun.* **8**, 15986 (2017).
296. Shi, H. *et al.* NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat. Immunol.* **17**, 250–258 (2016).

297. He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B. & Núñez, G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* **530**, 354–357 (2016).
298. Broz, P., Pelegrín, P. & Shao, F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 143–157 (2020).
299. Weng, D. *et al.* Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7391–7396 (2014).
300. Orning, P. *et al.* Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science* **362**, 1064–1069 (2018).
301. Shigeoka, A. A. *et al.* An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 6277–6285 (2010).
302. Wang, W. *et al.* Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF- β signaling in kidney epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 1239–1249 (2013).
303. Accogli, T., Hibos, C. & Vegran, F. Canonical and non-canonical functions of NLRP3. *J. Adv. Res.* S2090-1232(23)00001–2 (2023) doi:10.1016/j.jare.2023.01.001.
304. Wang, H. *et al.* Inflammasome-independent NLRP3 is required for epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Exp. Cell Res.* **342**, 184–192 (2016).
305. Bracey, N. A. *et al.* Mitochondrial NLRP3 protein induces reactive oxygen species to promote Smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *J. Biol. Chem.* **289**, 19571–19584 (2014).
306. Kim, S.-M. *et al.* Inflammasome-Independent Role of NLRP3 Mediates Mitochondrial Regulation in Renal Injury. *Front. Immunol.* **9**, 2563 (2018).
307. Periasamy, S., Le, H. T., Duffy, E. B., Chin, H. & Harton, J. A. Inflammasome-Independent NLRP3 Restriction of a Protective Early Neutrophil Response to Pulmonary Tularemia. *PLoS Pathog.* **12**, e1006059 (2016).
308. Christgen, S. & Kanneganti, T.-D. Inflammasomes and the fine line between defense and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **62**, 39–44 (2020).
309. Song, S. *et al.* Knockdown of NLRP3 alleviates high glucose or TGF β 1-induced EMT in human renal tubular cells. *J. Mol. Endocrinol.* **61**, 101–113 (2018).
310. Lech, M. *et al.* NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF- β receptor signalling. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 2224–2235 (2015).
311. Bruchard, M. *et al.* The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat. Immunol.* **16**, 859–870 (2015).
312. Park, S.-H., Ham, S., Lee, A., Möller, A. & Kim, T. S. NLRP3 negatively regulates Treg differentiation through Kpna2-mediated nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* **294**, 17951–17961 (2019).
313. Braga, T. T. *et al.* NLRP3 gain-of-function in CD4+ T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **133**, 1901–1916 (2019).

314. Liu, Y., Li, C., Yin, H., Zhang, X. & Li, Y. NLRP3 Inflammasome: A Potential Alternative Therapy Target for Atherosclerosis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* **2020**, 1561342 (2020).
315. Liu, T. *et al.* USP19 suppresses inflammation and promotes M2-like macrophage polarization by manipulating NLRP3 function via autophagy. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 2431–2442 (2021).
316. Yao, C. *et al.* Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation* **138**, 2227–2242 (2018).
317. Scott, L. *et al.* NLRP3 inflammasome is a key driver of obesity-induced atrial arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* **117**, 1746–1759 (2021).
318. Arbore, G. *et al.* T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4⁺ T cells. *Science* **352**, aad1210 (2016).
319. Arbore, G. *et al.* Complement receptor CD46 co-stimulates optimal human CD8⁺ T cell effector function via fatty acid metabolism. *Nat. Commun.* **9**, 4186 (2018).
320. Erttmann, S. F. *et al.* Loss of the DNA Damage Repair Kinase ATM Impairs Inflammasome-Dependent Anti-Bacterial Innate Immunity. *Immunity* **45**, 106–118 (2016).
321. Bodnar-Wachtel, M. *et al.* NLRP3 controls ATM activation in response to DNA damage. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.05.12.087015> (2020) doi:10.1101/2020.05.12.087015.
322. Neven, B., Prieur, A.-M. & dit Maire, P. Q. Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **4**, 481–489 (2008).
323. Ben-Chetrit, E. *et al.* Consensus proposal for taxonomy and definition of the autoinflammatory diseases (AIDs): a Delphi study. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 1558–1565 (2018).
324. Gordon, E. M. *et al.* Apolipoprotein E is a concentration-dependent pulmonary danger signal that activates the NLRP3 inflammasome and IL-1 β secretion by bronchoalveolar fluid macrophages from asthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* **144**, 426-441.e3 (2019).
325. Besnard, A.-G. *et al.* NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy* **66**, 1047–1057 (2011).
326. Qi, X. *et al.* Critical role of caspase-8-mediated IL-1 signaling in promoting Th2 responses during asthma pathogenesis. *Mucosal Immunol.* **10**, 128–138 (2017).
327. Ather, J. L. *et al.* Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome and promotes Th17 allergic asthma in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 64–73 (2011).
328. Niemi, K. *et al.* Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 6119–6128 (2011).
329. Chen, S. *et al.* Blockade of the NLRP3/Caspase-1 Axis Ameliorates Airway Neutrophilic Inflammation in a Toluene Diisocyanate-Induced Murine Asthma Model. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **170**, 462–475 (2019).
330. van den Boorn, J. G. *et al.* Inflammasome-Dependent Induction of Adaptive NK Cell Memory. *Immunity* **44**, 1406–1421 (2016).
331. Lucin, K. M. & Wyss-Coray, T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* **64**, 110–122 (2009).

332. Villeda, S. A. *et al.* Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat. Med.* **20**, 659–663 (2014).
333. Heneka, M. T., Golenbock, D. T. & Latz, E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat. Immunol.* **16**, 229–236 (2015).
334. Heneka, M. T. *et al.* NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* **493**, 674–678 (2013).
335. Halle, A. *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* **9**, 857–865 (2008).
336. Tejera, D. *et al.* Systemic inflammation impairs microglial A β clearance through NLRP3 inflammasome. *EMBO J.* **38**, e101064 (2019).
337. Ising, C. *et al.* NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* **575**, 669–673 (2019).
338. Gris, D. *et al.* NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 974–981 (2010).
339. Inoue, M., Williams, K. L., Gunn, M. D. & Shinohara, M. L. NLRP3 inflammasome induces chemotactic immune cell migration to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 10480–10485 (2012).
340. Inoue, M. *et al.* Interferon- β therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome. *Sci. Signal.* **5**, ra38 (2012).
341. Gao, Q. *et al.* Blockade of CD47 ameliorates autoimmune inflammation in CNS by suppressing IL-1-triggered infiltration of pathogenic Th17 cells. *J. Autoimmun.* **69**, 74–85 (2016).
342. Galea, J. *et al.* Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1000–1006 (1996).
343. Bevilacqua, M. P., Poher, J. S., Majeau, G. R., Cotran, R. S. & Gimbrone, M. A. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* **160**, 618–623 (1984).
344. Bevilacqua, M. P., Poher, J. S., Wheeler, M. E., Cotran, R. S. & Gimbrone, M. A. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J. Clin. Invest.* **76**, 2003–2011 (1985).
345. Kirii, H. *et al.* Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 656–660 (2003).
346. Bhaskar, V. *et al.* Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **216**, 313–320 (2011).
347. Whitman, S. C., Ravisankar, P. & Daugherty, A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma. *Circ. Res.* **90**, E34–38 (2002).

348. Toldo, S. *et al.* Interleukin-18 mediates interleukin-1-induced cardiac dysfunction. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **306**, H1025–H1031 (2014).
349. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
350. Menu, P. *et al.* Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell Death Dis.* **2**, e137 (2011).
351. Usui, F. *et al.* Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 162–168 (2012).
352. Hendrikx, T. *et al.* Bone marrow-specific caspase-1/11 deficiency inhibits atherosclerosis development in *Ldlr*^{-/-} mice. *FEBS J.* **282**, 2327–2338 (2015).
353. Zheng, F., Xing, S., Gong, Z., Mu, W. & Xing, Q. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators Inflamm.* **2014**, 507208 (2014).
354. Zheng, F., Xing, S., Gong, Z. & Xing, Q. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis. *Heart Lung Circ.* **22**, 746–750 (2013).
355. Shi, X., Xie, W.-L., Kong, W.-W., Chen, D. & Qu, P. Expression of the NLRP3 Inflammasome in Carotid Atherosclerosis. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* **24**, 2455–2466 (2015).
356. Liu, W. *et al.* Activation in M1 but not M2 Macrophages Contributes to Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction in Rats: a Critical Role of the Calcium Sensing Receptor/NLRP3 Inflammasome. *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 2483–2500 (2015).
357. Louwe, M. C. *et al.* Absence of NLRP3 Inflammasome in Hematopoietic Cells Reduces Adverse Remodeling After Experimental Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl. Sci.* **5**, 1210–1224 (2020).
358. Tardif, J.-C. *et al.* Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2497–2505 (2019).
359. Bouabdallaoui, N. *et al.* Time-to-treatment initiation of colchicine and cardiovascular outcomes after myocardial infarction in the Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial (COLCOT). *Eur. Heart J.* **41**, 4092–4099 (2020).
360. Abbate, A. *et al.* Interleukin-1 Blockade Inhibits the Acute Inflammatory Response in Patients With ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *J. Am. Heart Assoc.* **9**, e014941 (2020).
361. Ridker, P. M. Canakinumab for Residual Inflammatory Risk. *Eur. Heart J.* **38**, 3545–3548 (2017).
362. Ridker, P. M. *et al.* Inhibition of Interleukin-1 β by Canakinumab and Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 2405–2414 (2018).
363. Hu, C. *et al.* NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11318–11323 (2015).
364. Carlos, D. *et al.* Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome and Predisposes to Type 1 Diabetes in Murine Model. *Front. Immunol.* **8**, 164 (2017).

365. Lindegaard, B. *et al.* Interleukin-18 activates skeletal muscle AMPK and reduces weight gain and insulin resistance in mice. *Diabetes* **62**, 3064–3074 (2013).
366. Zaki, M. H. *et al.* The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* **32**, 379–391 (2010).
367. Martin, B. N. *et al.* T cell-intrinsic ASC critically promotes T(H)17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Immunol.* **17**, 583–592 (2016).
368. Wu, B. *et al.* RAS P21 Protein Activator 3 (RASA3) Specifically Promotes Pathogenic T Helper 17 Cell Generation by Repressing T-Helper-2-Cell-Biased Programs. *Immunity* **49**, 886-898.e5 (2018).
369. Theivanthiran, B. *et al.* Tumor-intrinsic NLRP3-HSP70-TLR4 axis drives premetastatic niche development and hyperprogression during anti-PD-1 immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabq7019 (2022).
370. Theivanthiran, B. *et al.* A tumor-intrinsic PD-L1/NLRP3 inflammasome signaling pathway drives resistance to anti-PD-1 immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **130**, 2570–2586 (2020).
371. Asea, A. *et al.* Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**, 15028–15034 (2002).
372. Blumenthal, A. *et al.* The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* **108**, 965–973 (2006).
373. Park, H. W. *et al.* Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell* **162**, 780–794 (2015).
374. Wang, G. *et al.* Targeting YAP-Dependent MDSC Infiltration Impairs Tumor Progression. *Cancer Discov.* **6**, 80–95 (2016).
375. Bruchard, M. *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* **19**, 57–64 (2013).
376. Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 233–240 (2005).
377. Chalmin, F. *et al.* Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* **36**, 362–373 (2012).
378. Thibaudin, M. *et al.* Human ectonucleotidase-expressing CD25^{high} Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. *OncolImmunology* **5**, e1055444 (2016).
379. Annunziato, F. & Romagnani, S. The transient nature of the Th17 phenotype. *Eur. J. Immunol.* **40**, 3312–3316 (2010).
380. Loos, J. *et al.* Functional characteristics of Th1, Th17, and ex-Th17 cells in EAE revealed by intravital two-photon microscopy. *J. Neuroinflammation* **17**, 357 (2020).
381. Williams, J. L. *et al.* Astrocyte-T cell crosstalk regulates region-specific neuroinflammation. *Glia* **68**, 1361–1374 (2020).
382. Hu, D. *et al.* Transcriptional signature of human pro-inflammatory TH17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* **8**, 1600 (2017).

383. Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* **13**, 991–999 (2012).
384. Ramesh, R. *et al.* Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J. Exp. Med.* **211**, 89–104 (2014).
385. Hunder, N. N. *et al.* Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2698–2703 (2008).
386. Muranski, P. & Restifo, N. P. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 200–208 (2009).
387. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
388. Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15**, 1170–1178 (2009).
389. Pang, I. K., Ichinohe, T. & Iwasaki, A. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8⁺ T cell responses to influenza A virus. *Nat. Immunol.* **14**, 246–253 (2013).
390. Van Den Eeckhout, B. *et al.* Selective IL-1 activity on CD8+ T cells empowers antitumor immunity and synergizes with neovasculature-targeted TNF for full tumor eradication. *J. Immunother. Cancer* **9**, e003293 (2021).
391. Eriksson, U. *et al.* Activation of Dendritic Cells through the Interleukin 1 Receptor 1 Is Critical for the Induction of Autoimmune Myocarditis. *J. Exp. Med.* **197**, 323–331 (2003).
392. Bousso, P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 675–684 (2008).
393. Mohamadzadeh, M. *et al.* Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2880–2885 (2005).
394. Lugo-Villarino, G., Maldonado-Lopez, R., Possemato, R., Penaranda, C. & Glimcher, L. H. T-bet is required for optimal production of IFN- γ and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7749–7754 (2003).
395. Klarnet, J. P. *et al.* Helper-independent CD8+ cytotoxic T lymphocytes express IL-1 receptors and require IL-1 for secretion of IL-2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **142**, 2187–2191 (1989).
396. Gülich, A. F. *et al.* Differential Requirement of Cd8 Enhancers E8I and E8VI in Cytotoxic Lineage T Cells and in Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
397. Bertrand, F. *et al.* Blocking Tumor Necrosis Factor α Enhances CD8 T-cell-Dependent Immunity in Experimental Melanoma. *Cancer Res.* **75**, 2619–2628 (2015).
398. Gianni, T. *et al.* Genotype of Immunologically Hot or Cold Tumors Determines the Antitumor Immune Response and Efficacy by Fully Virulent Retargeted oHSV. *Viruses* **13**, 1747 (2021).
399. Qiu, Z., Chu, T. H. & Sheridan, B. S. TGF- β : Many Paths to CD103+ CD8 T Cell Residency. *Cells* **10**, 989 (2021).

400. Gunderson, A. J. *et al.* TGF β suppresses CD8+ T cell expression of CXCR3 and tumor trafficking. *Nat. Commun.* **11**, 1749 (2020).
401. Malenica, I. *et al.* Integrin- α V-mediated activation of TGF- β regulates anti-tumour CD8 T cell immunity and response to PD-1 blockade. *Nat. Commun.* **12**, 5209 (2021).
402. Mishra, S. *et al.* TGF- β and Eomes control the homeostasis of CD8+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **218**, e20200030 (2021).
403. Thomas, D. A. & Massagué, J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**, 369–380 (2005).
404. Igalouzene, R. *et al.* SMAD4 TGF- β -independent function preconditions naive CD8+ T cells to prevent severe chronic intestinal inflammation. *J. Clin. Invest.* **132**, e151020 (2022).
405. Park, B. V. *et al.* TGF β 1-Mediated SMAD3 Enhances PD-1 Expression on Antigen-Specific T Cells in Cancer. *Cancer Discov.* **6**, 1366–1381 (2016).
406. Tone, Y. *et al.* Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* **9**, 194–202 (2008).
407. Tu, E. *et al.* T Cell Receptor-Regulated TGF- β Type I Receptor Expression Determines T Cell Quiescence and Activation. *Immunity* **48**, 745-759.e6 (2018).
408. Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M. & Swartz, M. A. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* **328**, 749–752 (2010).
409. Lesch, S. *et al.* T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours. *Nat. Biomed. Eng.* **5**, 1246–1260 (2021).
410. Garetto, S. *et al.* Tailored chemokine receptor modification improves homing of adoptive therapy T cells in a spontaneous tumor model. *Oncotarget* **7**, 43010–43026 (2016).
411. Li, S. *et al.* Cancer immunotherapy via targeted TGF- β signalling blockade in TH cells. *Nature* **587**, 121–125 (2020).
412. Haque, S. & Morris, J. C. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 1741–1750 (2017).

Annexes

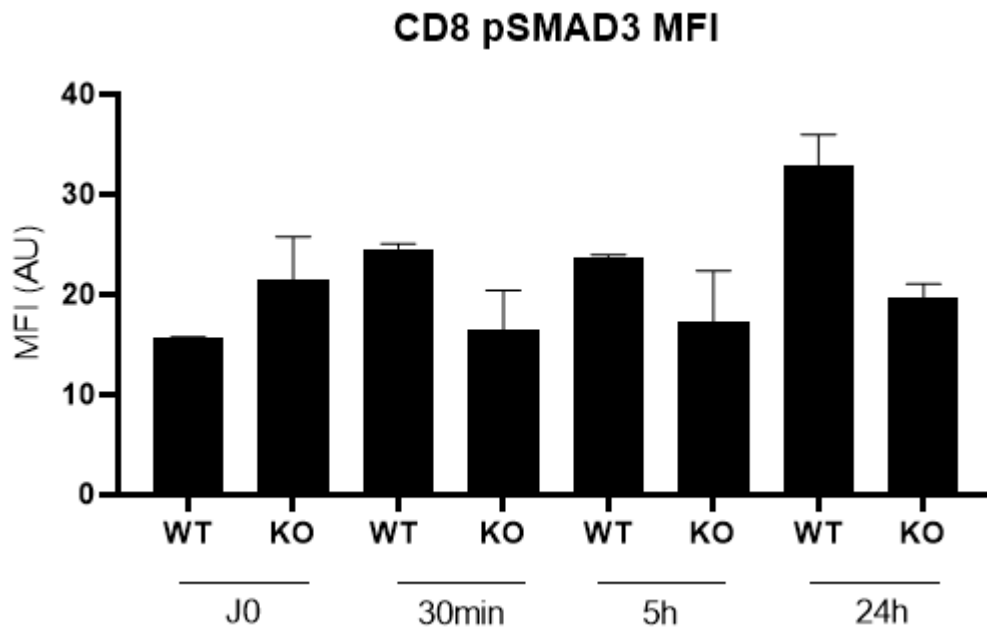
Cluster	Genes	Avg_log2FC	pval_adj
1 : T_eff_memory	AY036118	1,7732139	2,37E-166
1 : T_eff_memory	Rpl23a	0,74864346	8,59E-67
1 : T_eff_memory	Cxcl2	1,25679672	3,37E-54
1 : T_eff_memory	Fcer1g	-0,65698913	6,26E-50
1 : T_eff_memory	Gm47283	-1,13617716	7,16E-49
1 : T_eff_memory	Rpl35	-0,61925771	2,33E-44
1 : T_eff_memory	Rpl5	0,5659974	1,88E-36
1 : T_eff_memory	Tsix	0,95814954	1,15E-29
1 : T_eff_memory	Il7r	0,8664633	2,50E-26
1 : T_eff_memory	Eno1	-0,68784218	4,63E-25
1 : T_eff_memory	Fabp5	1,13247567	1,02E-22
1 : T_eff_memory	Thbs1	0,61340025	4,73E-21
1 : T_eff_memory	Tln1	0,62642042	1,45E-18
1 : T_eff_memory	Nfkbia	0,63183724	4,13E-18
1 : T_eff_memory	Ptprc	0,44242044	3,25E-17
1 : T_eff_memory	Ahnak	0,55364093	4,96E-17
1 : T_eff_memory	Arg1	0,89174416	4,47E-16
1 : T_eff_memory	Tax1bp1	0,58979987	6,18E-15
1 : T_eff_memory	Trbc1	0,77074101	3,01E-14
1 : T_eff_memory	Emb	0,56903193	4,21E-13
1 : T_eff_memory	Itgb1	0,57655893	1,19E-12
1 : T_eff_memory	Mxd1	0,48362315	1,27E-12
1 : T_eff_memory	Plek	0,5837496	1,70E-12
1 : T_eff_memory	Tpr	0,55131257	3,05E-12
1 : T_eff_memory	Ankrd11	0,54444457	3,57E-12
1 : T_eff_memory	Slfn2	0,47229688	4,32E-12
1 : T_eff_memory	Gzmf	-0,68607039	8,60E-12
1 : T_eff_memory	Ifi207	0,58251779	9,41E-12
1 : T_eff_memory	Smchd1	0,48876935	1,67E-11
1 : T_eff_memory	Akap13	0,4103633	5,37E-10
1 : T_eff_memory	mt-Nd5	0,47730113	6,27E-10
2 : cellules en division	AY036118	1,50988086	3,86E-93
2 : cellules en division	Gm42418	1,51831927	2,71E-90
2 : cellules en division	Rpl23a	0,7928106	1,10E-72
2 : cellules en division	Rpl5	0,68619479	4,43E-58
2 : cellules en division	Gm47283	-1,03872907	4,88E-27
2 : cellules en division	Rps17	0,51457803	2,23E-24
2 : cellules en division	Eno1	-0,62281499	4,02E-17
2 : cellules en division	Tsix	0,72696371	1,29E-16
2 : cellules en division	Tpr	0,59285491	3,06E-16
2 : cellules en division	Smarca5	0,59077563	2,44E-14
2 : cellules en division	Kmt2e	0,51139422	1,30E-11

2 : cellules en division	Ablim1	0,61419005	9,02E-10
2 : cellules en division	Fcer1g	-0,60725323	1,50E-09
2 : cellules en division	mt-Nd5	0,60454814	1,87E-09
2 : cellules en division	Ppp1r16b	0,51139463	2,72E-09
2 : cellules en division	Mycbp2	0,50199978	3,21E-09
2 : cellules en division	Kmt2a	0,5388989	4,22E-09
2 : cellules en division	Tax1bp1	0,5032107	1,05E-08
2 : cellules en division	Baz1b	0,50173585	1,23E-08
2 : cellules en division	Ncor1	0,51221991	4,74E-08
2 : cellules en division	Tln1	0,47818301	5,58E-08
2 : cellules en division	Hnrnpab	0,47747412	1,69E-07
2 : cellules en division	Smc2	0,4941862	2,66E-07
2 : cellules en division	Serpib9	0,42295777	3,67E-07
2 : cellules en division	Nabp1	0,45220019	6,65E-07
2 : cellules en division	Ptp4a2	0,39332531	1,73E-06
2 : cellules en division	Ahnak	0,46397901	3,48E-06
3 : Exhausted	Gm47283	-1,04674715	1,71E-38
3 : Exhausted	AY036118	0,95664628	4,77E-37
3 : Exhausted	Ablim1	0,56647449	2,90E-17
3 : Exhausted	Ifi208	-0,66147643	7,82E-14
3 : Exhausted	Serpib9	0,5316184	7,08E-13
3 : Exhausted	Rnf125	0,46320563	8,06E-13
3 : Exhausted	2900026A02Rik	0,45394796	8,08E-12
3 : Exhausted	Fcer1g	-0,78926391	3,92E-11
3 : Exhausted	Prex1	0,43938563	1,54E-09
3 : Exhausted	Mxd1	0,42585281	2,29E-09
3 : Exhausted	Creb3l2	0,47064557	1,13E-08
3 : Exhausted	Pim1	0,40103405	4,64E-08
3 : Exhausted	Gramd3	0,46041444	5,93E-08
3 : Exhausted	Cwc25	0,3503744	6,07E-08
3 : Exhausted	Mknk2	0,3327154	8,12E-08
3 : Exhausted	Map2k3	0,28856144	8,69E-08
3 : Exhausted	Eif3c	0,37147349	1,32E-07
3 : Exhausted	Cdk12	0,37353307	1,56E-07
3 : Exhausted	Casp8ap2	0,36646524	4,03E-07
3 : Exhausted	Dnajc3	0,36603294	8,65E-07
3 : Exhausted	Kdm2b	0,34467151	1,70E-06
3 : Exhausted	Epb41	0,43570793	1,82E-06
3 : Exhausted	Foxo1	0,41645767	2,93E-06
3 : Exhausted	Hspa4	0,3172897	3,40E-06
3 : Exhausted	Rhoq	0,29502971	5,76E-06
3 : Exhausted	2810474O19Rik	0,39993461	1,44E-05
3 : Exhausted	Gm26699	0,27880351	1,95E-05
3 : Exhausted	Top2b	0,30204476	2,57E-05
3 : Exhausted	Pdap1	0,30415891	2,81E-05

3 : Exhausted	Crebbp	0,26714895	0,00012162
4 : Naif	Gm47283	-1,75622159	2,75E-16
4 : Naif	AY036118	1,05323182	5,15E-16
4 : Naif	Gramd3	0,79477879	4,18E-08
4 : Naif	Tnfaip3	0,81363678	1,67E-07
4 : Naif	Zcchc11	0,71379744	6,83E-07
4 : Naif	Tln1	0,70316625	1,37E-06
4 : Naif	Pde4b	0,69751725	1,71E-06
4 : Naif	Zc3hav1	0,69536513	5,99E-06
4 : Naif	Cxcr4	0,76234844	7,16E-06
4 : Naif	Emb	0,62317146	7,34E-06
4 : Naif	Tax1bp1	0,74442019	1,29E-05
4 : Naif	Crem	0,72770681	1,54E-05
4 : Naif	Smad7	0,61350185	3,00E-05
4 : Naif	Kdm6b	0,91684534	3,40E-05
4 : Naif	Nfkbia	0,63545684	4,45E-05
4 : Naif	Smarca5	0,63651976	0,00010687
4 : Naif	Dusp5	0,69441177	0,00013741
4 : Naif	Arap2	0,63134262	0,00018803
4 : Naif	Chd7	0,73021224	0,00020674
4 : Naif	Neurl3	0,61777413	0,00028807
4 : Naif	Zeb1	0,63963833	0,0003959
4 : Naif	Epb41	0,58867053	0,00075001
4 : Naif	Tgif1	0,58256061	0,00105868
4 : Naif	Ubald2	0,56260268	0,00122321
4 : Naif	Arid5a	0,55533772	0,00192466
4 : Naif	Stat4	0,64114753	0,00520573
4 : Naif	Gpr132	0,52213536	0,00527428
4 : Naif	Nabp1	0,43618178	0,00541886
4 : Naif	Bptf	0,38788819	0,00764117
4 : Naif	Rnf125	0,34656158	0,00810542
4 : Naif	Pim1	0,36107003	0,01051482
4 : Naif	Ankrd11	0,46727084	0,02868899
	5 Cd74	2,40540741	3,23E-31
	5 H2-Ab1	2,6687537	2,01E-24
	5 H2-Aa	2,51123639	2,92E-22
	5 H2-Eb1	2,40643523	4,14E-21
	5 Gm47283	-1,49495773	1,36E-19
	5 Hspa1a	-1,73182674	4,39E-17
	5 Gzmf	-1,05130056	6,16E-14
	5 Hspa1b	-1,62928649	1,47E-13
	5 Tsix	1,7229794	8,49E-13
	5 Eno1	-0,89344024	1,05E-11
	5 Il1b	1,65747153	2,66E-09
	5 Ctsw	-0,96129472	2,91E-09

5	Ccl2	-1,07447104	1,42E-08
5	Ier5l	-0,83173199	2,03E-07
5	Lag3	-0,70927275	7,28E-07
5	Cxcr6	-0,74614042	1,57E-06
5	Ifng	-0,67820905	4,16E-06
5	Selplg	-0,6934387	4,64E-06
5	Bcl2	-0,77106348	8,91E-06
5	Gm156	-0,55362288	1,91E-05
5	Ikzf2	-0,66041231	2,18E-05
5	mt-Nd3	-0,8394556	2,94E-05
5	H2-T22	-0,72833238	4,91E-05
5	Tgfb1	-0,6374442	0,00019721
5	Nr4a2	-0,65492399	0,00021878
5	Spp1	-0,38581499	0,0003534
5	H2-Q6	-0,60069941	0,00035751
5	Rsrp1	-0,51455264	0,00466748
5	Ugcg	-0,44608051	0,00966262
5	Ctla2a	-0,48206451	0,02070226

Annexe 1 : liste des gènes surexprimés dans les T CD8 *Nlrp3*^{-/-} infiltrant des tumeurs du côlon MC38



Annexe 2 : Cinétique de phosphorylation de SMAD3 dans des T CD8 naïfs WT ou *Nlrp3*^{-/-} après traitement par 2ng.mL⁻¹ de TGF- β (MFI)

Travaux collaboratifs

The Tumor Microenvironment Impairs Th1 IFN γ Secretion through Alternative Splicing Modifications of Irf1 Pre-mRNA.

Bernard, A., **Hibos, C.**, Richard, C., Viltard, E., Chevrier, S., Lemoine, S., Melin, J., Humblin, E., Mary, R., Accogli, T., Chalmin, F., Bruchard, M., Peixoto, P., Hervouet, E., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Végran, F. and Boidot, R., 2021. *Cancer Immunology Research*, 9(3), pp.324-336.

Il est clairement établi que le système immunitaire est impliqué dans la réponse aux traitements contre le cancer. Cependant, l'influence du microenvironnement tumoral sur les cellules immunitaires n'est pas complètement connue. Dans ce contexte, il est de plus en plus décrit que le l'épissage alternatif peut influencer l'expression des gènes des cellules immunitaires. Nous avons montré que le microenvironnement tumoral est capable, à travers la sécrétion de TGF- β , d'activer l'épissage alternatif et la production d'une isoforme du facteur de transcription IRF1 (IRF1D7) dans les cellules Th1. Nos résultats montrent que le facteur d'épissage SFPQ (splicing factor, proline and glutamine-rich) est responsable de la production de cette isoforme IRF1D7. Nous avons aussi montré que chez la souris et l'Homme, cette isoforme alternative d'IRF1 altère l'activité transcriptionnelle d'IRF1 sur le promoteur du gène *Il12rb1*, qui code pour une sous-unité du récepteur à l'IL-12, conduisant à une diminution de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules Th1. De plus, nous avons montré que l'expression de l'isoforme IRF1D7 est accrue dans les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral. Enfin, nous avons montré qu'inhiber l'isoforme IRF1D7 pouvait potentialiser l'effet antitumoral des cellules Th1.

Role of NLRP3 in CD8 T cells biology

C. Hibos, L. Milian, F. Chalmin, L. Clerc, M. Geindreau, J. Melin, A. Micallef, T. Accogli, E. Humblin, E. Jacquin, R. Boidot, M. Bruchard, R. Mary, A. Bernard, F. Ghiringhelli, F. Vegran

Statut : en préparation

NLRP3 drives Th17 trans-differentiation through non-canonical function

T. Accogli*, **C. Hibos***, J. Melin, E. Humblin, R. Mary 2, A. Bernard, F. Chalmin, M. Bruchard, C. Richard, S. Macedo, S. Lerouge, S. Chevrier, A. Garcia, E. Jacquin, C. Paul, B. Ryffel, L. Apetoh, R. Boidot, F. Ghiringhelli, and F. Vegran.

Statut : En révision (Immunity)

Accogli, T., **Hibos, C.** and Vegran, F. (2023) "Canonical and non-canonical functions of NLRP3," Journal of Advanced Research [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.01.001>.

Mary, R., Chalmin, F., Accogli, T., Bruchard, M., **Hibos, C.**, Melin, J., Truntzer, C., Limagne, E., Derangère, V., Thibaudin, M., Humblin, E., Boidot, R., Chevrier, S., Arnould, L., Richard, C., Klopfenstein, Q., Bernard, A., Urade, Y., Harker, J., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. and Végran, F., 2022. Hematopoietic Prostaglandin D2 Synthase Controls Tfh/Th2 Communication and Limits Tfh Antitumor Effects. *Cancer Immunology Research*, 10(7), pp.900-916.

Bruchard, M., Geindreau, M., Perrichet, A., Truntzer, C., Ballot, E., Boidot, R., Racœur, C., Barsac, E., Chalmin, F., **Hibos, C.**, Baranek, T., Paget, C., Ryffel, B., Rébé, C., Paul, C., Végran, F. and Ghiringhelli, F., 2022. Recruitment and activation of type 3 innate lymphoid cells promote antitumor immune responses. *Nature Immunology*, 23(2), pp.262-274.

Niogret, J., Berger, H., Rebe, C., Mary, R., Ballot, E., Truntzer, C., Thibaudin, M., Derangère, V., **Hibos, C.**, Hampe, L., Rageot, D., Accogli, T., Joubert, P., Routy, B., Harker, J., Vegran, F., Ghiringhelli, F. and Chalmin, F., 2021. Follicular helper-T cells restore CD8+-dependent antitumor immunity and anti-PD-L1/PD-1 efficacy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(6), p.e002157.

Profil ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0191-363X>

Présentations scientifiques

Présentation poster les 17 et 18 Novembre 2021 au **12^{ème} Forum du Cancéropôle Est**, à Dijon

Flashtalk et présentation poster au **10th Scientific Days on Autophagy of CFATG**, les 31 mai au 2 juin à Besançon

Présentation et **prix du meilleur oral** au **Forum des Jeunes Chercheurs**, session Cancérologie 2, les 16 et 17 Juin 2022, à Dijon.

Lauréat de la bourse de mobilité du Cancéropôle Est pour la participation au congrès "6th Cancer World Congress".

Présentation orale et **prix du jury du meilleur "flash talk"** au **6th Cancer World Congress**, à Lisbonne, Portugal, du 28 au 30 septembre 2022.

NLRP3 drives Th17 trans-differentiation through non-canonical function

T. Accogli^{1,2,3}, C. Hibos^{2,3}, J. Melin², E. Humblin², R. Mary², A. Bernard², F. Chalmin⁴, M. Bruchard^{1,2}, C. Richard⁵, S. Macedo², S. Lerouge², S. Chevrier⁵, A. Garcia², E. Jacquin^{1,2,6}, C. Paul^{7,8}, B. Ryffel⁹, L. Apetoh^{1,2,10,11}, R. Boidot⁵, F. Ghiringhelli^{1,2,4,12,13}, and F. Vegran^{1,2,6*}.

Affiliations :

¹ INSERM U1231, Dijon, France.

² University of Burgundy, Dijon, France

³ These authors contributed equally

⁴ Cancer Biology Transfer Platform, Georges-Francois Leclerc Cancer Center-UNICANCER, Dijon, France

⁵ Unité de Biologie Moléculaire - Department of Biology and Pathology of Tumors, Georges-Francois Leclerc Cancer Center-UNICANCER, Dijon, France.

⁶ INSERM UMR-S 1193, Université Paris-Saclay, Orsay, France

⁷ LIIC, EA7269, Université de Bourgogne Franche Comté, 21000 Dijon, France.

⁸ Immunology and Immunotherapy of Cancer Laboratory, EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France

⁹ Laboratory of Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics (INEM), UMR 7355 CNRS-University of Orleans, Orléans, France.

¹⁰ INSERM, U1100, Tours, France

¹¹ Faculté de Médecine, Université de Tours, Tours, France

¹² Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France.

¹³ Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France;

*Correspondence to: frederique.vegran@inserm.fr

Abstract

Th17 cells may exert regulatory or inflammatory functions according to the cytokine microenvironment. These plastic cells can transdifferentiate in Tregs during the resolution of inflammation, in allogenic heart transplantation models or in cancer in mechanisms that are still poorly understood. Here, we found that NLRP3 expressed in Th17 is essential in maintaining immunosuppressive functions of Th17 cells through non-canonical functions. In the absence of NLRP3, Th17 cells produce more inflammatory cytokines (IFN- γ , Granzyme B, TNF α) and are less immunosuppressive towards CD8 cells. Moreover, Th17 deficient for NLRP3 lose their ability to transdifferentiate into Treg-like cells. In Th17 cells, NLRP3 binds to the TGF- β receptor and allows SMAD3 phosphorylation that facilitates the acquisition of immunosuppressive functions. Therefore, invalidation of NLRP3 expression in Th17 cells of tumour-bearing mice allows CD8 cells to be more effective, which inhibits tumour growth.

Key words: Th17 cells, Tregs, trans differentiation, NLRP3

INTRODUCTION

Th17 cells are characterized by their capacity to secrete IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and CCL20 (Dong, 2008, Liang *et al.*, 2006). Th17 cells develop from naive CD4⁺ T cells in the presence of TGF- β and IL-6 (Stritesky *et al.*, 2008). The initiation of their transcriptional program depends on TCR activation leading to IRF4 and BATF transcription factor expression, on IL-6 that induces STAT3 activation, and on TGF- β that is responsible for several pathways among which the SMADs (Ciofani *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008). These molecular pathways induce Th17 differentiation that is controlled by the master transcription factor Retinoic acid-related Orphan Receptor- γ t (*ROR γ t*) (Yang *et al.*, 2008). Th17 cell population is limited in healthy mice, but relatively expanded in the blood, bone marrow, and spleen of tumor-bearing mice. Th17 cell expansion was also observed in human cancers such as melanoma, prostate cancer, fibrosarcoma, and advanced head and neck cancer (Miyahara *et al.*, 2008; Sfanos *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2010). Despite these observations, the role of Th17 cells in cancer immunity remains controversial. Although the molecular bases for these discrepancies are elusive, several studies suggest that Th17 cells may exert regulatory or inflammatory functions, also called pathogenic, depending on the cytokine microenvironment (Alizadeh *et al.*, 2013).

Th17 appear to be plastic cells that can transdifferentiate into Th1 or Treg cells. The conversion of Th17 into Tregs has been studied in different contexts. It has been described that Th17 cells can transdifferentiate during the resolution of inflammation, into IL-10 producing Treg, Tr1 (Gagliani *et al.*, 2015). Moreover, Th17 cells could be a source of Tregs in allogenic heart transplantation models (Obermajer *et al.*, 2014). In human cancers, Foxp3⁺ ROR γ t⁺ IL17⁺ cells

can be found at tumour site. Th17 transdifferentiation into Tregs in tumors has also been documented in mice (Downs-Canner *et al.*, 2017) but the mechanisms involved are still poorly understood.

The NLRP3 protein is a member of the Nod-Like Receptor (NLR) family. It has been largely studied in myeloid cells. Upon detection of a danger signal, the cytoplasmic NLRP3 protein interacts with the adaptor Apoptosis-associated Speck-like protein (ASC) and caspase-1 to form a macromolecular complex called the NLRP3 inflammasome. It leads to cleavage and activation of Caspase-1 precursor and then induces the cleavage and maturation of IL-1 β and IL-18, involved in the induction of inflammation. Non-canonical functions of NLRP3 were recently described. In lymphoid cells, NLRP3 expression has been detected in Human and murine CD4 T cells (Doitsh *et al.*, 2014). We previously observed that the NLRP3 protein plays an important role during Th2 differentiation. In CD4 T cells, IL-2 produced after TCR activation is responsible for NLRP3 expression in a STAT5-dependent manner. We have unveiled an inflammasome independent function of NLRP3 acting as a transcription factor in Th2 cells through its interaction with IRF4 (Bruchard *et al.*, 2015).

Here, we address the role of NLRP3 in Th17 cells in the context of cancer. We found that NLRP3 is expressed in Th17 cells. NLRP3 is essential in maintaining immunosuppressive functions of Th17 cells. In the absence of NLRP3, Th17 cells express more inflammatory cytokines (IFN- γ , Granzyme B, TNF α) and are less immunosuppressive towards CD8 cells. Moreover, Th17 deficient for NLRP3 lose their ability to transdifferentiate into Treg-like cells. In Th17 cells, NLRP3 binds to the TGF- β receptor and allows SMAD3 phosphorylation that facilitates the acquisition of immunosuppressive functions. Therefore, invalidation of NLRP3 expression in

Th17 cells of tumour-bearing mice allows CD8 cells to be more effective, which inhibits tumour growth.

RESULTS

NLRP3 is involved in Th17 cell differentiation.

In a previous work, we demonstrated a role of NLRP3 in Th2 differentiation (Bruchard *et al.*, 2015). To test the role of NLRP3 in CD4 T cells, we have generated *Nlrp3* flox mice. We floxed *Nlrp3* gene (exon 4) in the mouse genome using the Cre-loxP system. When crossed with CD4cre mice, Cre-recombinase removes *Nlrp3* 4th exon leading to a premature STOP codon in CD4 T cells (SD1a). We validated NLRP3 deficiency by ImmunoFluorescent staining in CD4 isolated from CD4Cre-*Nlrp3*^{flox/flox} mice (further called CD4^{*Nlrp3*^{-/-}}) by differentiating them into Th2 and comparing the staining with cells isolated from WT mice or totally deficient for *Nlrp3*. We observed not only that the cells did not express NLRP3 but also that they expressed less *Gata-3*, the Th2 specific transcription factor and *Il4*, the major cytokine they produce (SD1b and c).

To understand the effect of NLRP3 on CD4 T cell behaviour, we isolated naive CD4 T cells from CD4^{*Nlrp3*^{-/-}} mice and littermate controls and differentiated them *in vitro* in Th1, Th2, Th17 and Tregs and analysed their master transcription factors and cytokine expression by RT-qPCR. First, we confirmed that Th2 cells were inhibited as shown by *Gata3* and *il4* reduced expression (SD2). Then, we observed that Th17 cells are impacted. Indeed, their IFN- γ production was increased at mRNA and protein levels in the absence of NLRP3 (SD2 and Fig 1a and b). *Nlrp3* deficiency does not change Th17 cell proliferation (SD3a).

To test the role of NLRP3 in CD4 T cells during tumor growth, we compared the growth of different transplantable subcutaneous tumors (B16F10 melanoma and LLC1 lung cancer) in CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice and littermate controls. We observed that *Nlrp3* deficiency in CD4 T cells reduces tumor growth of B16F10 and LLC1 tumor growth. Interestingly, IL-4 blocking antibody did not affect LLC1 tumor growth and lesser affected B16F10 growth (Fig. 1c and d), suggesting that the slowing of tumor growth in CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice is not solely attributable to NLRP3 effect on Th2 differentiation and IL-4 production.

The canonical role of NLRP3 is its involvement in inflammasome and IL-1 β /IL18 secretion (Arend *et al.*, 2008). IL-1 β production was equivalent in tumors from CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice compared to controls, while IL-1 β production was completely abolished in tumors beared by *Nlrp3* total knock out mice (SD3b). Contrary to macrophages, CD4 T cells isolated from littermate or CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice did not secrete IL-1 β /IL18 upon stimulation with NLRP3 classical activators (SD3c). Inhibition of inflammasome either using Caspase-1 (ZVAD) or Caspase-8 (ZIETD) inhibitors, MCC950 (that inhibits inflammasome assembly) or Anakinra that targets IL-1RA during *in vitro* Th17 differentiation did not increase *Ifng* expression as observed in *Nlrp3* deficient Th17 cells (SD3d). In the same way, CD4 T cells isolated from *Asc*, *Ice*, *Il1r1* and *Il18r* deficient mice did not harbour an increase in *Ifng* expression when differentiated into Th17 (SD3e). Moreover, *in vivo*, mouse treatment with MCC950 did not affect B16F10 or LLC1 tumor growth compared to control (SD3f and g) indicating inflammasome has no impact on LLC1 tumor growth.

Upon immunomonitoring, CD4 T cells TILs and isolated from draining lymph nodes of B16F10 tumor bearing mice produced more IFN- γ at mRNA (SD3h) and protein levels in CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice compared to control mice (SD3i and Fig 1e). Among the CD4 T lymphocytes infiltrating B16F10

tumors, we observed that Th17 cells characterized as CCR6⁺RORγt⁺FOXP3⁻ produced more IFNγ at mRNA (SD3j) and protein levels (Fig 1f) in CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice than in their controls. Using Digoxin that was previously described as blocking the activity of RORγt and therefore inducing Th17 cell depletion (Huh *et al.*, 2011), we observed that B16F10 (Fig 1g) and LLC1 (SD4a) tumor growth was reduced in control mice in an equivalent manner as in CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice and. In contrast, Digoxin aborts the antitumor effect of CD4^{Nlrp3^{-/-}}, suggesting this effect is completely dependent on Th17 cells (Fig 1h). These data were confirmed in RORγt deficient mice (Fig 1i and SD4b).

Together, these results indicate that *Nlrp3* deficiency could affect Th17 activity in cancer and reduce tumor growth in an inflammasome independent manner.

NLRP3 deficiency favors a Th17 inflammatory profile.

Our results showed that in absence of *Nlrp3*, Th17 cells produce high level of IFNγ. To characterize the molecular state of Th17 cells according to their *Nlrp3* status, we measured the mRNA profiles of *in vitro* differentiated Th17 cells using RNASeq. We compared the gene expression profiles of WT or *Nlrp3*-deficient Th17 cells, differentiated *ex vivo* with TGF-β and IL-6 to generate Th17 cells with a regulatory profile or by stimulation with IL-1β, IL-6, IL-23 without TGF-β to generate inflammatory Th17 cells. Some WT CD4 were also differentiated in Th1 as a control. The results indicated Th17 cells deficient in *Nlrp3* have a major difference in transcriptional profile compared to WT Th17. The lack of *Nlrp3* resulted in differential expression of 759 genes (FDR ≤ 0.05) compared to WT Th17, of which 463 increased and 296 decreased gene expression, indicating that NLRP3 has both activating and repressing effects in Th17 cells. Unsupervised hierarchical clustering and PCA analysis revealed that Th17

deficient in *Nlrp3* acquired a transcriptomic profile closely related to inflammatory Th17 (Fig 2a and b).

Based on previous publications (Ghoreschi *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2012; Ramesh *et al.*, 2014), we focused on 31 genes characteristic of the inflammatory Th17 cell transcriptomic profile. Among these 31 genes, 17 were overexpressed in *Nlrp3* deficient Th17 cells at 72h differentiation (Fig 2c). Using kinetic RNASeq analysis we observed that the inflammatory profile increases with time in Th17 cells deficient in *Nlrp3* at 24h (Fig 2d) and 72h (Fig 2e) of differentiation. To confirm these data, we analysed the expression of these gene by RT-qPCR on WT Th17 and deficient in *Nlrp3* cells during a kinetic of 24h, 72h and 7 days. The results confirmed that Th17 deficient in *Nlrp3* acquired a stable inflammatory profile over the time (Fig 2f). Finally, we validated at the protein level the expression of the inflammatory cytokines IFN γ (Fig 1a, b et SD2), TNF α , Granzyme B and GM-CSF (encoded by *csf2* gene) in *Nlrp3* deficient Th17 cells generated *in vitro* (SD4c-e). *In vivo*, we confirmed our data in B16F10 tumors. We isolated CD4⁺CCR6⁺Foxp3⁻ TILs, a population enriched in Th17 cells, and evaluated the inflammatory signature expression profile according to the 15 most relevant genes previously identified. We observed that the inflammatory profile of Th17 cells is also enhanced in TILs from CD4^{Nlrp3}^{-/-} mice compared to littermate control (Fig 2g).

We previously showed that intratumor immunosuppressive Th17 cells are characterized by the membrane expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases that convert ATP into AMP harbouring immunosuppressive properties (Chalmin *et al.*, 2012). To determine whether the absence of NLRP3 affects ectonucleotidases, we analyzed their expression by RT-qPCR and cytometry. The results indicate that there was no difference in the gene expression of *Entpd1* and *Nt5e* encoding CD39 and CD73 respectively (SD4f and g), and no difference in their

membrane expression (SD4h). In addition, there was no difference in the consumption of ATP (SD4i) by these cells nor in the AMP production (SD4j). Inflammatory Th17 cells are characterized by a higher glycolytic activity (Papadopoulou and Xanthou, 2022). Thus, we studied the glycolytic activity of Th17 cells deficient in *Nlrp3* and compared it to WT Th17 and inflammatory Th17 cells. Our results indicate that there was no switch in the metabolism of Th17 cells deficient in NLRP3 (SD4k-m).

Taken together, these data show that *Nlrp3* deficiency induces a partial switch from immunosuppressive phenotype to inflammatory phenotype of Th17 cells.

Th17 deficient for NLRP3 lose their immunosuppressive functions.

Th17 cells differentiated from WT OTII or OTII *Nlrp3*^{-/-} mice (having class II MHC specific for ovalbumin) have no toxicity against B16OVA cells (SD5a). Thus, we tested whether Th17 indirectly affect tumor growth by activating other immune cells. Using NK depleting mAb or liposome clodronate to eliminate macrophages, we showed that NK cell and macrophage blockades did not have a major impact on tumor growth in CD4^{Nlrp3}^{-/-} mice (SD5b and c). In contrast, anti-CD8 depleting antibody completely abolished the tumor growth delay observed in CD4^{Nlrp3}^{-/-} mice (Fig 3a). Immunomonitoring underlined that CD8 cells accumulated more in TILs from CD4^{Nlrp3}^{-/-} mice (Fig 3b). These cells produced more IFN γ and Granzyme B (Fig 3c and d) and proliferated more (Fig 3e) than in littermate controls. The level of checkpoint inhibitor receptors was not affected (not shown).

Th17 cells were described as immunosuppressive cells (Chalmin *et al.*, 2012). We tested Th17 immunosuppressive activity on CD8 lymphocytes *in vitro*. CD8 isolated from OTI mice (expressing class I MHC specific for ovalbumin) were stimulated *in vitro* with SIINFEKL peptide

and cultured with Th17 cells differentiated from OTII or OTII^{Nlrp3^{-/-}} naive CD4 T cells. While WT Th17 impeded IFN γ , Granzyme B and TNF α production of CD8 T cells, Th17 deficient for *Nlrp3* did not inhibit production of IFN γ (Fig 3f), Granzyme B (Fig 3g) and TNF α (Fig 3h) by CD8 T cells nor their proliferation (Fig 3i). From B16F10 tumor bearing mice, we isolated CD8 TILs from CD4^{Nlrp3^{-/-}} and their littermate controls, CD8 were then co-cultured with B16F10 cells for 24h *ex vivo*. We observed that CD8 cells from CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice present higher cytotoxic activity compared to cells sorted from littermate controls (Fig 3j)

Taken together, these results indicate that Th17 cells limit CD8 antitumor capacity in a NLRP3-dependent manner.

NLRP3 non-canonical functions are involved in Th17 cells.

NLRP3 inflammasome has been shown to participate in CD4 differentiation (Arbore *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). We previously demonstrated that the NLRP3 inflammasome is not involved in our experimental conditions (SD3b-g).

Ifn γ can be regulated by the transcription factors Tbet (encoded by *Tbx21* gene), IRF1 or Eomes. We therefore analyzed their expression during a kinetic in Th17 deficient in NLRP3 (SD5d-f). Surprisingly, increased *Ifn γ* expression was induced earlier than Tbet, IRF1 or Eomes in CD4^{Nlrp3^{-/-}} Th17 cells suggesting these transcriptional factors are not implicated in *Ifn γ* regulation here (SD5g). *Ifn γ* expression can also be induced via the STAT1 pathway but STAT1 phosphorylation was identical in WT and NLRP3 deficient cells (SD5h and i).

Th17 cells are differentiated in the presence of IL-6 and TGF- β . TGF- β can inhibit the effector functions of immune cells and therefore limit the production of inflammatory cytokines such as IFN γ . To find out whether « NLRP3 signalling » converges towards the TGF β pathway, we

first used pharmacological inhibitors making it possible to block various signalling pathways downstream of the TGF- β receptor. We underlined that SMAD3 inhibitor used during Th17 differentiation induced *Ifn γ* expression in WT Th17 cells while it had no effects into Th17 deficient in *Nlrp3* (Fig 4a). During Th17 differentiation, TGF- β receptor activation induces SMAD3 phosphorylation as detected by ImmunoFluorescent staining in WT Th17 while it is completely abolished in Th17 cells deficient for *Nlpr3* (Fig 4b). Indeed, the level of total SMAD3 was not impeded (SD5j). Using Proximity Ligation Assay (PLA) no interaction was observed between NLRP3 and pSMAD3, but an interaction between NLRP3 and TGF- β receptor was detected (Fig 4c).

To validate that SMAD3 may be responsible for inhibiting *Ifn γ* transcription, we analysed the *Ifn γ* promoter with Matinspector and identified a putative pSMAD3 binding site at -551 to -561. pSMAD3 ChIP experiments in Th17 WT or deficient for *Nlrp3* allowed us to observe an enrichment of the promoter in WT Th17 cells while this is not the case in Th17 *Nlrp3*^{-/-} (Fig 4d). We previously observed Granzyme B, TNF α and GM-CSF were induced in *Nlrp3* deficient Th17 cells (SD4c-e). We analysed their promoters with Matinspector and identified putative pSMAD3 binding sites: -782 to -789 for *Csf2* and -313 to -323 for *Tnf α* but no putative binding site in *Gzmb* promoter. ChIP experiments to compare pSMAD3 binding in Th17 WT or deficient for *Nlrp3* showed an enrichment of *Csf2* promoter (Fig 4e) in WT Th17 but no enrichment of *Tnf α* (Fig 4f). Granzyme B, TNF α and GM-CSF can also be induced by IFN γ . We tested the effect of an IFN γ blocking antibody during Th17 differentiation. We observed that IFN γ only dictated *Granzyme B* expression but did not affect *Tnf α* and *Csf2* expressions (SD6a-c).

Together these data indicate that NLRP3 participates in Th17 cell differentiation by directly regulating TGF- β -SMAD3 pathway that directly inhibits *Ifn γ* and *Csf2* expression.

NLRP3 deficiency inhibits Th17 transdifferentiation in Treg.

As expected, immunomonitoring of CD4 TILs in both B16F10 (Fig 5a) and LLC1 tumors (Fig 5b) showed a reduced frequency of Th2 cells, but surprisingly, Tregs in CD4 *Nlrp3*^{-/-} mice compared to littermate were also reduced. These results contrast with *in vitro* data showing *Nlrp3* deficiency did not affect Treg differentiation (SD2 and 6d). We hypothesised that NLRP3 may affect the capacity of Th17 cells to transdifferentiate into Tregs. Naive CD4 T cells isolated from CD4^{Nlrp3}^{-/-} mice and their controls were differentiated *in vitro* into Th17 cells in the presence of TGF- β and IL-6. A subset of ROR γ t⁺ Th17 cells expressed Foxp3 in control mice at day 3 while it was not the case in Th17 deficient in *Nlrp3* (Fig 5c) and the number of cells expressing Foxp3 is increasing over time during *in vitro* differentiation in WT Th17 cells (Fig 5d). To determine whether this difference is observable *in vivo*, we first differentiated naïve CD4 from CD45.2 OTII or CD45.2 OTII deficient for *Nlrp3* mice into Th17. Then, we transferred them into congenic WT mice (expressing the CD45.1 allele) bearing B16OVA tumors. After 48h, we analysed the CD4 infiltrates of the lungs of mice and observed more Foxp3⁺ cells in the lungs of mice transferred with WT Th17 than in the lungs of mice having received Th17 *Nlrp3*^{-/-} (Fig 5e). Moreover, we did not observe differences in Th1 and Th17 frequency identified according to their membrane markers (SD6e and f). By analysing TILs, we observed that Foxp3⁺ CD4 T cells from CD45.1 host mice were not impacted by Th17 adoptive transfer (Fig 5f). On the other hand, the quantity of Foxp3⁺ cells among the transferred CD45.2 was greater in the mice having received an adoptive transfer of WT Th17 than in the mice having received an adoptive transfer of Th17 *Nlrp3*^{-/-} (Fig 5f). In addition, the frequency of cells simultaneously expressing Foxp3 and ROR γ t is also greater among CD45.2 differentiated in WT Th17 than in Th17 *Nlrp3*^{-/-} (Fig 5g). Similar results were observed when adoptive transfers of WT OTII Th17 or OTII Th17 *Nlrp3*^{-/-}

were performed in CD4^{Rorc}^{-/-} mice, lacking Th17 (Fig 5h). Finally, we used an anti-CD25 blocking antibody to target Treg cells *in vivo* during B16F10 tumor growth in CD4^{Nlrp3}^{-/-} mice and littermate controls and observed that the antibody drastically slowed down tumor growth in the WT CD4 mice (Fig 5i) while CD25 depletion modestly affect tumor growth in the CD4^{Nlrp3}^{-/-} mice (Fig 5j).

Taken together, these data indicate that NLRP3 is involved in Foxp3 expression of Th17 cells that impede tumor growth control.

Targeting NLRP3 in Th17 cells has a therapeutic value.

To determine if NLRP3 could be used as a therapeutic target, we crossed CD4creERT2 mice with NLRP3 flox mice. Thus, NLRP3 deletion in CD4 can be induced by Tamoxifen treatment after tumor implantation. By treating the mice when the tumors were palpable, we were able to induce a slowdown in B16F10 tumor growth (Fig 6a).

In the context of cellular therapy, Th17 cell differentiation with TGF- β and IL-6 has been shown to have pro-tumor properties (Chalmin *et al.*, 2012). Using transfer adoptive experiments, we observed that the transfer of Th17 cells differentiated from OTII^{Nlrp3}^{-/-} mice into WT mice, reduced the number of B16-OVA lung tumor foci (Fig 6b). By analysing tumor infiltrate, we observed more Tregs after WT Th17 adoptive transfer than after Th17^{Nlrp3}^{-/-} adoptive transfer (Fig 6c). Analysing CD8 infiltrate, we observed that CD8 cells from mice receiving Th17^{Nlrp3}^{-/-} produced more IFN γ (Fig 6d), more Granzyme B (Fig 6e) and more TNF α (Fig 6f). Anti-CD8 depleting antibody completely aborted the anti tumor effect of adoptive transfer of OTII Th17^{Nlrp3}^{-/-}, demonstrating the essential role of CD8 during this cellular therapy (Fig 6g). In the same experiment, we also evaluated the effect of anti-CD25 antibody, used to target

Tregs, and observed a decrease in lung tumor foci in mice receiving WT Th17 whereas anti-CD25 did not increase the anti-tumor effect of Th17^{Nlrp3^{-/-}} adoptive transfer (Fig 6h).

Taken together, these data suggest that targeting NLRP3 functions in CD4 T cells may have therapeutic value.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated NLRP3 is required for Th17 to Tregs transdifferentiation. In Th17 cells, NLRP3 harbors non-canonical functions. Indeed, it interacts with the TGF- β receptor and participates in TGF- β -SMAD3 pathway. Therefore, NLRP3 inhibits inflammatory cytokine production leading to not only an immunosuppressive phenotype of Th17 cells but also favoring their trans-differentiation into Tregs. Using mouse transgenic models, we observed that targeting NLRP3 in CD4 T cells and thus in Th17 cells, reduced CD8 immunosuppression and increased their antitumor functions.

NLRP3 is well known for its functions in the NLRP3 inflammasome that forms in myeloid cells detecting a danger signal. Thus, it is mainly in this function that NLRP3 in cancers has been studied. Studies are contradictory (Mathur *et al.*, 2018). Mice deficient for NLRP3 (but also for another component of the inflammasome) are more prompt to develop colon tumors following AzOxyMethane/Dextran Sodium Sulfate treatment. These data highlight a protective effect of the NLRP3 inflammasome in colorectal cancers (Allen *et al.*, 2010; Dupaul-Chicoine *et al.*, 2010; Hirota *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010; Neven *et al.*, 2004; Zaki *et al.*, 2010). By enhancing the production of IL-1 β , NLRP3 was shown to facilitate microbiota remodeling and induce Tregs that compensates for deleterious inflammation (Yao *et al.*, 2017). Thus, mice

deficient in *Nlrp3* have fewer lung metastases in an orthotopic tumor model (Guo *et al.*, 2016). NLRP3 can also promote the development of gastric and cutaneous tumors (Karki and Kanneganti, 2019), indeed IL-1 β signaling in T cells and epithelial cells can be pro-tumorigenic (Dmitrieva-Posocco *et al.*, 2019). Finally, a high expression of NLRP3 predicts a poor survival of patients with breast cancer through induction of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in breast (Marandi *et al.*, 2021) but also in colorectal cancer (Wang *et al.*, 2021).

The involvement of NLRP3 in CD4 has been poorly studied. In 2015, we were the first to show that NLRP3 was expressed in CD4 T cells through an IL-2-dependent pathway. In addition, we demonstrated its role as a transcription factor in Th2 cells where it participates in the pro tumor properties of these cells (Bruchard *et al.*, 2015). In this new study, our results showed Th2 cells were not the only CD4 subtype impacted by NLRP3 but that Th17 cells were as well. As a result, tumors for which Th17 cells are involved saw their growth slowed down by *Nlrp3* deficiency in CD4 T cells. Finally, contrary to Park SH *et al.* publication, we did not observe any direct implication of NLRP3 in Tregs differentiation (Park *et al.*, 2019).

Th17 cells are characterized by the production of IL-17 and the expression of the transcription factor ROR γ t (Harrington *et al.*, 2005; Langrish *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). The role of Th17 cells in cancer is controversial depending on the tumor site but also on the surrounding cytokines affecting cell differentiation. The presence of TGF- β induces cells with an immunosuppressive phenotype, through the expression of ectonucleotidases CD39 and CD73 and the release of adenosine (Chalmin *et al.*, 2012; Thibaudin *et al.*, 2016). The TCR overstimulation has also been linked to an immunosuppressive phenotype of Th17 cells through epigenetic modifications of *Foxp3* leading to a lasting increase in its expression (Annunziato and Romagnani, 2010). At the same time, Th17 cells differentiated without TGF- β , express

Tbet and produce IFN γ conditioning their inflammatory but also inflammatory phenotype in the development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (McGeachy *et al.*, 2007). In our study, we observed that Th17 cells deficient for *Nlrp3* differentiated *in vitro* in the presence of TGF- β possessed a transcriptome similar to inflammatory Th17 cells described in the literature (Hu *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2012; Ramesh *et al.*, 2014) and this phenotype is stable over time and observable in mouse tumors.

The antitumor role of Th17 cells has been explored in adoptive transfer experiments. The therapeutic effect of Th17 cells relied on IFN γ rather than IL-17A (Muranski *et al.*, 2008) and is due to the inflammatory response leading to tumor infiltration by DCs, and NK cells (Martin-Orozco *et al.*, 2009), but also CD8 T cells that looks more proliferative and more cytotoxic (Ankathatti Munegowda *et al.*, 2011). Although Th17 cells could eradicate tumors when transferred into mice, they could also act as regulatory cells capable of suppressing antitumor immunity (Zou and Restifo, 2010) by two main distinct mechanisms. First, Th17 cells release adenosine upon TGF- β conditions (Chalmin *et al.*, 2012; Thibaudin *et al.*, 2016). Then, they are able to convert into Tregs (Gomez-Rodriguez *et al.*, 2014; Weaver *et al.*, 2006). In our study, we observed that *Nlrp3* deficient Th17 cells lost their immunosuppressive properties as observed by increased CD8 activity *in vitro* and *in vivo*. Since *Nlrp3* deficient Th17 cells still express the same level of ectonucleotidases and are still able to produce adenosine, their immunosuppressive activity could be offset by their release of inflammatory cytokines. Indeed, Th17 deficient in *Nlrp3* produce IFN γ that directly stimulates CD8 cells (Whitmire *et al.*, 2005). They also produce GM-CSF that stimulates CD8 cells *via* dendritic cell activation (Becher *et al.*, 2016). Finally, they produce TNF α , involved in the activation, proliferation and recruitment of CD8 cells thanks to TNFR2 receptor (Calzascia *et al.*, 2007).

In mice, IL-6 in combination with TGF- β induces immunosuppressive Th17 cells (Bettelli *et al.*, 2006; Chalmin *et al.*, 2012; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006). IL-6 activates a STAT3-dependent pathway essential for IL-17 production through ROR γ t and ROR α induction (Yang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). TGF- β binds to its receptor TGF- β -R and initiates many signaling cascades such as the SMAD pathway, the TRAF6/TAK1 pathway then PI3K/Akt, MAPK P38, ERK and JNK pathways, but also Rho-like GTPases (David and Massague, 2018). SMAD3 is phosphorylated by the TGF- β -R, then it is supported by SMAD4 for nuclear translocation (Feng and Derynck, 2005; Massague *et al.*, 2005) where it plays a role as a transcription factor to induce or inhibit gene expression. In Th17, pSMAD3 blocks the expression of genes encoding Tbet and STAT4 resulting in a decrease in IFN γ expression (Gorelik *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2005). In our study, we observed that in the absence of NLRP3, Th17 cells produce IFN γ , GM-CSF and TNF α independently of the transcription factors previously described to regulate their expression (Tbet, Eomes, IRF1, STAT1, STAT4). We observed that NLRP3 interacts with the TGF- β -R and participates in SMAD3 phosphorylation that directly inhibits the expression of IFN γ , GM-CSF and TNF- α by binding to their promoter. In the absence of NLRP3, SMAD3 is not phosphorylated and the preceding genes are expressed. Several studies have shown a link between NLRP3 and the TGF- β -R/SMAD3 pathway. In urothelial cells (Shih *et al.*, 2021) and in cardiac fibrosis (Pan *et al.*, 2019), IL-1 β produced by the NLRP3 inflammasome is responsible for a TGF- β overproduction inducing the TGF- β -R/SMAD3 pathway. In our experiments, IL-1 β was not differentially produced. A study has shown that pSMAD3 is abolished in *Nlrp3* and *Asc* deficient mice resulting in a decrease in TGF- β -induced EMT in cancerous kidney cells in a NLRP3 inflammasome-independent way (Wang *et al.*, 2013). In our project, the results were different in NLRP3 and ASC deficient cells. Finally, in cardiac fibroblasts, there is a loss of

pSMAD3 in *Nlrp3* deficient mice according to ROS production (Bracey *et al.*, 2014), the production of which does not vary in our experimental conditions (not shown).

Th17 cells exhibit plasticity allowing them to transdifferentiate into Th1-like or Treg-like cells (Becattini *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2014). They are able to switch to Th1-like cells in an environment containing IL-12 or IL-23 (Bending *et al.*, 2009; Hirota *et al.*, 2011a; Lee *et al.*, 2009) or, conversely, to a Treg profile in the presence of TGF- β and/or Prostaglandin E2 (PGE2) (Downs-Canner *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2008). When we analyzed CD4 tumor infiltrates from WT or CD4^{*Nlrp3*^{-/-}} mice, we observed a reduction in Th2 cells as expected (Bruchard *et al.*, 2015) but also a reduction in Treg cells. Since we did not observe that NLRP3 influenced Treg differentiation, we focused on Th17 cells and observed they lose the ability to acquire Foxp3 expression and lose the ability to transdifferentiate into Tregs *in vitro* and *in vivo* when *Nlrp3* was deleted. The transdifferentiation of Th17 cells into Tregs seem to involve several factors. A switch in glucose metabolism (Cluxton *et al.*, 2019; Kalim *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2011) or an inhibition of fatty acid oxidation favors development of Tregs (Berod *et al.*, 2014). PGE2 in combination with TGF- β also seems to participate in the transdifferentiation of Th17 into Treg (Downs-Canner *et al.*, 2017). Here, our results showed an essential role of NLRP3 in the TGF- β pathway allowing the transdifferentiation of Th17. Our results regarding Treg differentiation in the absence of NLRP3 may seem surprising because Tregs are also induced in presence of TGF- β but other studies have already shown that even if pSMAD3 is required for optimal Tregs, its absence does not prevent Foxp3 expression and Treg generation in SMAD3 deficient mice (Gu *et al.*, 2012; Takimoto *et al.*, 2010). Our data support that pSMAD3-independent TGF- β signaling pathways are sufficient for Treg differentiation.

Our results confirmed that Th17 cells is a major source of Tregs in the tumor bed. The identification of a Th17 transdifferentiation warrants novel therapeutic approaches in targeting Tregs to limit immunosuppression. Indeed, the reduction of tumor growth by an anti-CD25 antibody preferentially depleting Tregs is no longer observed in CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice. Thus, rather than eliminating Tregs cells, targeting Th17 cells transdifferentiation under the effect of TGF- β by blocking NLRP3 functions in CD4 T cells, could be a method to reduce Tregs and increase IFN γ produced by Th17 cells. Even if still controverted, NLRP3 has previously been described to restrict T cell antitumor immunity (Ding *et al.*, 2022; Ju *et al.*, 2021; van Deventer *et al.*, 2010). A recent study showed that pharmacological inhibition of NLRP3 blocks the recruitment of MDSC and improves the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy (Theivanthiran *et al.*, 2020). NLRP3 therefore seems to have a therapeutic interest but only its functions as a member of the inflammasome have been targeted so far and inflammasome inhibitors do not affect the non-canonical functions of NLRP3. Finally, preclinical data has highlighted the potential of CD4 T cells adoptive transfer to mediate tumor rejection (Hunder *et al.*, 2008; Muranski and Restifo, 2009). In this context, Th17 cells had no effect in a lung tumor focus model, but *Nlrp3* deficient Th17 cells had an antitumor effect associated with an increase in CD8 activity.

In summary, we have shown that through its interaction with TGF- β -R, NLRP3 facilitates the phosphorylation of SMAD3 and the inhibition of the production of inflammatory cytokines in Th17 cells. NLRP3 has a key role in the transdifferentiation of Th17 cells into Treg. Because of this new function, NLRP3 appears as an additional lead in the development of new therapeutic strategies aimed at eliminating the pool of Tregs present in tumors.

Acknowledgments:

We thank Valerie Saint-Giorgio and the animal research facility (University of Burgundy) for their assistance with animal experimentations. This work was also possible thanks to the help of Flow Cytometry Core Facility/ INSERM LNC-UMR1231, at the University of Burgundy (<http://www.cytometrie-dijon.fr>), for cell sorting experiments. Authors would like to thank the “Centre de Zootechnie” (<http://recherche.u-bourgogne.fr/potentiel-de-recherche/plateformes-technologiques/centre-de-zootechnie.html>) for providing animal bred facilities.

The team is supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipes labellisées), the Institut National du Cancer (INCa), the Région Bourgogne-Franche-Comte (BFC), and the I-Site-BFC program. This work was also supported by Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, Ligue contre le Cancer CCIR-GE, French Government grant managed by the French National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021, Ministère de l’Enseignement supérieur et de la Recherche and by the Fondation de France.

Author contributions:

T. A. contributed to data curation, formal analysis, investigation, methodology, project administration, validation, visualization, writing-original draft. C. H. contributed to data curation, formal analysis, investigation, methodology, project administration, validation. J. M., R.M., contributed to data curation, investigation, validation. E. H. contributed to data curation, formal analysis, investigation, methodology, project administration. A. B., S.M., L.C., S.L., S.C. contributed to data curation, investigation, F. C. contributed to formal analysis, validation. M. B., C.P. Writing-review and editing. C. R. contributed to data curation, formal

analysis, Software. A. G., E. J., B.R., L.A. contributed to resources, R. B. contributed to data curation, methodology, project administration, resources, supervision, F. G. contributed to funding acquisition, writing-review and editing and F. V. contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, supervision, visualization, writing.

Conflict of interests:

F. Ghiringhelli received speaker honoraria from Lilly, Sanofi, BMS, Astra Zeneca and Amgen, received funding for clinical trials from Astra Zeneca, received travel grants from Roche France, Amgen and Servier, and is an advisory board member for Merck Serano, Amgen, Roche France and Sanofi. No other authors have any potential conflict of interest to disclose.

References:

- Alizadeh, D., Katsanis, E., and Larmonier, N. (2013). The multifaceted role of Th17 lymphocytes and their associated cytokines in cancer. *Clin Dev Immunol* 2013, 957878.
- Allen, I.C., TeKippe, E.M., Woodford, R.M., Uronis, J.M., Holl, E.K., Rogers, A.B., Herfarth, H.H., Jobin, C., and Ting, J.P. (2010). The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med* 207, 1045-1056.
- Ankathatti Munegowda, M., Deng, Y., Mulligan, S.J., and Xiang, J. (2011). Th17 and Th17-stimulated CD8(+) T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60, 1473-1484.
- Annunziato, F., and Romagnani, S. (2010). The transient nature of the Th17 phenotype. *European journal of immunology* 40, 3312-3316.
- Arbore, G., West, E.E., Spolski, R., Robertson, A.A., Klos, A., Rheinheimer, C., Dutow, P., Woodruff, T.M., Yu, Z.X., O'Neill, L.A., *et al.* (2016). T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. *Science* 352, aad1210.
- Arend, W.P., Palmer, G., and Gabay, C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 223, 20-38.
- Becattini, S., Latorre, D., Mele, F., Foglierini, M., De Gregorio, C., Cassotta, A., Fernandez, B., Kelderman, S., Schumacher, T.N., Corti, D., *et al.* (2015). T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4(+) T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science* 347, 400-406.
- Becher, B., Tugues, S., and Greter, M. (2016). GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity* 45, 963-973.
- Bending, D., De la Pena, H., Veldhoen, M., Phillips, J.M., Uyttenhove, C., Stockinger, B., and Cooke, A. (2009). Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 565-572.
- Berod, L., Friedrich, C., Nandan, A., Freitag, J., Hagemann, S., Harmrolfs, K., Sandouk, A., Hesse, C., Castro, C.N., Bahre, H., *et al.* (2014). De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nature medicine* 20, 1327-1333.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Bracey, N.A., Gershkovich, B., Chun, J., Vilaysane, A., Meijndert, H.C., Wright, J.R., Jr., Fedak, P.W., Beck, P.L., Muruve, D.A., and Duff, H.J. (2014). Mitochondrial NLRP3 protein induces reactive oxygen species to promote Smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *The Journal of biological chemistry* 289, 19571-19584.
- Bruchard, M., Rebé, C., Derangère, V., Togbé, D., Ryffel, B., Boidot, R., Humblin, E., Hamman, A., Chalmin, F., Berger, H., *et al.* (2015). The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nature immunology* 16, 859-870.
- Calzascia, T., Pellegrini, M., Hall, H., Sabbagh, L., Ono, N., Elford, A.R., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (2007). TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *The Journal of clinical investigation* 117, 3833-3845.
- Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Vegran, F., Hichami, A., Ladoire, S., Derangere, V., Vincent, J., Masson, D., *et al.* (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 36, 362-373.

Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C.N., Muratet, M., *et al.* (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* *151*, 289-303.

Cluxton, D., Petrasca, A., Moran, B., and Fletcher, J.M. (2019). Differential Regulation of Human Treg and Th17 Cells by Fatty Acid Synthesis and Glycolysis. *Frontiers in immunology* *10*, 115.

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

Ding, Y., Yan, Y., Dong, Y., Xu, J., Su, W., Shi, W., Zou, Q., and Yang, X. (2022). NLRP3 promotes immune escape by regulating immune checkpoints: A pan-cancer analysis. *International immunopharmacology* *104*, 108512.

Dmitrieva-Posocco, O., Dzutsev, A., Posocco, D.F., Hou, V., Yuan, W., Thovarai, V., Mufazalov, I.A., Gunzer, M., Shilovskiy, I.P., Khaitov, M.R., *et al.* (2019). Cell-Type-Specific Responses to Interleukin-1 Control Microbial Invasion and Tumor-Elicited Inflammation in Colorectal Cancer. *Immunity* *50*, 166-180 e167.

Doitsh, G., Galloway, N.L., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K.M., Zepeda, O., Hunt, P.W., Hatano, H., Sowinski, S., Munoz-Arias, I., and Greene, W.C. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* *505*, 509-514.

Downs-Canner, S., Berkey, S., Delgoffe, G.M., Edwards, R.P., Curiel, T., Odunsi, K., Bartlett, D.L., and Obermayer, N. (2017). Suppressive IL-17A(+)Foxp3(+) and ex-Th17 IL-17A(neg)Foxp3(+) Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nature communications* *8*, 14649.

Dupaul-Chicoine, J., Yeretssian, G., Doiron, K., Bergstrom, K.S., McIntire, C.R., LeBlanc, P.M., Meunier, C., Turbide, C., Gros, P., Beauchemin, N., *et al.* (2010). Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity* *32*, 367-378.

Feng, X.H., and Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 659-693.

Gagliani, N., Amezcua Vesely, M.C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N.W., de Zoete, M.R., Licona-Limon, P., Paiva, R.S., Ching, T., *et al.* (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* *523*, 221-225.

Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., *et al.* (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* *467*, 967-971.

Gomez-Rodriguez, J., Wohlfert, E.A., Handon, R., Meylan, F., Wu, J.Z., Anderson, S.M., Kirby, M.R., Belkaid, Y., and Schwartzberg, P.L. (2014). Itk-mediated integration of T cell receptor and cytokine signaling regulates the balance between Th17 and regulatory T cells. *J Exp Med* *211*, 529-543.

Gorelik, L., Constant, S., and Flavell, R.A. (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* *195*, 1499-1505.

Gu, A.D., Wang, Y., Lin, L., Zhang, S.S., and Wan, Y.Y. (2012). Requirements of transcription factor Smad-dependent and -independent TGF-beta signaling to control discrete T-cell functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 905-910.

Guo, B., Fu, S., Zhang, J., Liu, B., and Li, Z. (2016). Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Scientific reports* *6*, 36107.

Han, A., Glanville, J., Hansmann, L., and Davis, M.M. (2014). Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level. *Nat Biotechnol* *32*, 684-692.

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

Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., *et al.* (2011a). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature immunology* *12*, 255-263.

Hirota, S.A., Ng, J., Lueng, A., Khajah, M., Parhar, K., Li, Y., Lam, V., Potentier, M.S., Ng, K., Bawa, M., *et al.* (2011b). NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis* *17*, 1359-1372.

Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Booth, C.J., Strowig, T., Jin, C., Eisenbarth, S.C., and Flavell, R.A. (2010). Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLR4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 21635-21640.

Hu, D., Notarbartolo, S., Croonenborghs, T., Patel, B., Cialic, R., Yang, T.H., Aschenbrenner, D., Andersson, K.M., Gattorno, M., Pham, M., *et al.* (2017). Transcriptional signature of human pro-inflammatory TH17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis. *Nature communications* *8*, 1600.

Huh, J.R., Leung, M.W., Huang, P., Ryan, D.A., Krout, M.R., Malapaka, R.R., Chow, J., Manel, N., Ciofani, M., Kim, S.V., *et al.* (2011). Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ activity. *Nature* *472*, 486-490.

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

Ju, M., Bi, J., Wei, Q., Jiang, L., Guan, Q., Zhang, M., Song, X., Chen, T., Fan, J., Li, X., *et al.* (2021). Pan-cancer analysis of NLRP3 inflammasome with potential implications in prognosis and immunotherapy in human cancer. *Brief Bioinform* *22*.

Kalim, K.W., Yang, J.Q., Li, Y., Meng, Y., Zheng, Y., and Guo, F. (2018). Reciprocal Regulation of Glycolysis-Driven Th17 Pathogenicity and Regulatory T Cell Stability by Cdc42. *Journal of immunology* *200*, 2313-2326.

Karki, R., and Kanneganti, T.D. (2019). Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nature reviews. Cancer* *19*, 197-214.

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

Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., *et al.* (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* *13*, 991-999.

Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O., and Weaver, C.T. (2009). Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* *30*, 92-107.

Lin, J.T., Martin, S.L., Xia, L., and Gorham, J.D. (2005). TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4⁺ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. *Journal of immunology* *174*, 5950-5958.

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

Marandi, Y., Hashemzade, S., Tayebinia, H., Karimi, J., Zamani, A., and Khodadadi, I. (2021). NLRP3-inflammasome activation is associated with epithelial-mesenchymal transition and progression of colorectal cancer. *Iran J Basic Med Sci* 24, 483-492.

Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 31, 787-798.

Massague, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes & development* 19, 2783-2810.

Mathur, A., Hayward, J.A., and Man, S.M. (2018). Molecular mechanisms of inflammasome signaling. *Journal of leukocyte biology* 103, 233-257.

McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nature immunology* 8, 1390-1397.

Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J., and Wang, R.F. (2008). Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15505-15510.

Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., *et al.* (2008). Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 112, 362-373.

Muranski, P., and Restifo, N.P. (2009). Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells. *Current opinion in immunology* 21, 200-208.

Neven, B., Callebaut, I., Prieur, A.M., Feldmann, J., Bodemer, C., Lepore, L., Derfalvi, B., Benjaponpitak, S., Vesely, R., Sauvain, M.J., *et al.* (2004). Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood* 103, 2809-2815.

Obermajer, N., Popp, F.C., Soeder, Y., Haarer, J., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., and Dahlke, M.H. (2014). Conversion of Th17 into IL-17A(neg) regulatory T cells: a novel mechanism in prolonged allograft survival promoted by mesenchymal stem cell-supported minimized immunosuppressive therapy. *Journal of immunology* 193, 4988-4999.

Pan, X.C., Liu, Y., Cen, Y.Y., Xiong, Y.L., Li, J.M., Ding, Y.Y., Tong, Y.F., Liu, T., Chen, X.H., and Zhang, H.G. (2019). Dual Role of Triptolide in Interrupting the NLRP3 Inflammasome Pathway to Attenuate Cardiac Fibrosis. *International journal of molecular sciences* 20.

Papadopoulou, G., and Xanthou, G. (2022). Metabolic rewiring: a new master of Th17 cell plasticity and heterogeneity. *FEBS J* 289, 2448-2466.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 6, 1133-1141.

Park, S.H., Ham, S., Lee, A., Moller, A., and Kim, T.S. (2019). NLRP3 negatively regulates Treg differentiation through Kpna2-mediated nuclear translocation. *The Journal of biological chemistry* 294, 17951-17961.

Ramesh, R., Kozhaya, L., McKeivitt, K., Djuretic, I.M., Carlson, T.J., Quintero, M.A., McCauley, J.L., Abreu, M.T., Unutmaz, D., and Sundrud, M.S. (2014). Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med* 211, 89-104.

- Sfanos, K.S., Bruno, T.C., Maris, C.H., Xu, L., Thoburn, C.J., DeMarzo, A.M., Meeker, A.K., Isaacs, W.B., and Drake, C.G. (2008). Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *14*, 3254-3261.
- Shi, L.Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D.R., and Chi, H. (2011). HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med* *208*, 1367-1376.
- Shih, H.J., Chang, C.Y., Lai, C.H., and Huang, C.J. (2021). Therapeutic effect of modulating the NLRP3-regulated transforming growth factor-beta signaling pathway on interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Biomed Pharmacother* *138*, 111522.
- Su, X., Ye, J., Hsueh, E.C., Zhang, Y., Hoft, D.F., and Peng, G. (2010). Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *Journal of immunology* *184*, 1630-1641.
- Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., *et al.* (2010). Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *Journal of immunology* *185*, 842-855.
- Theivanthiran, B., Evans, K.S., DeVito, N.C., Plebanek, M., Sturdivant, M., Wachsmuth, L.P., Salama, A.K., Kang, Y., Hsu, D., Balko, J.M., *et al.* (2020). A tumor-intrinsic PD-L1/NLRP3 inflammasome signaling pathway drives resistance to anti-PD-1 immunotherapy. *The Journal of clinical investigation* *130*, 2570-2586.
- Thibaudin, M., Chaix, M., Boidot, R., Végran, F., Derangère, V., Limagne, E., Berger, H., Ladoire, S., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2016). Human ectonucleotidase-expressing CD25(high) Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. *Oncoimmunology* *5*, e1055444.
- van Deventer, H.W., Burgents, J.E., Wu, Q.P., Woodford, R.M., Brickey, W.J., Allen, I.C., McElvania-Tekippe, E., Serody, J.S., and Ting, J.P. (2010). The inflammasome component NLRP3 impairs antitumor vaccine by enhancing the accumulation of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* *70*, 10161-10169.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* *24*, 179-189.
- Wang, W., Wang, X., Chun, J., Vilaysane, A., Clark, S., French, G., Bracey, N.A., Trpkov, K., Bonni, S., Duff, H.J., *et al.* (2013). Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF-beta signaling in kidney epithelium. *Journal of immunology* *190*, 1239-1249.
- Wang, Y., Zhang, H., Xu, Y., Peng, T., Meng, X., and Zou, F. (2021). NLRP3 induces the autocrine secretion of IL-1beta to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications* *560*, 72-79.
- Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., and Murphy, K.M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* *24*, 677-688.
- Whitmire, J.K., Tan, J.T., and Whitton, J.L. (2005). Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med* *201*, 1053-1059.
- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., and Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry* *282*, 9358-9363.

Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., *et al.* (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28, 29-39.

Yao, X., Zhang, C., Xing, Y., Xue, G., Zhang, Q., Pan, F., Wu, G., Hu, Y., Guo, Q., Lu, A., *et al.* (2017). Remodelling of the gut microbiota by hyperactive NLRP3 induces regulatory T cells to maintain homeostasis. *Nature communications* 8, 1896.

Zaki, M.H., Boyd, K.L., Vogel, P., Kastan, M.B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.D. (2010). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 32, 379-391.

Zhao, C., Gu, Y., Zeng, X., and Wang, J. (2018). NLRP3 inflammasome regulates Th17 differentiation in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 197, 154-160.

Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M., Ivanov, I.I., Min, R., Victora, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., *et al.* (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453, 236-240.

Zou, W., and Restifo, N.P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* 10, 248-256.

MATERIALS AND METHODS

Mice, tumor challenge and treatment

C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). OT-II, OT-II $Nlrp3^{-/-}$, $Nlrp3^{-/-}$, CD4cre x $Nlrp3$ flox, CD4creERT2 x $Nlrp3$ flox, C57BL/6 Ly5.1a and OT-I (both kindly provided by Pr Apetoh), were in breeding at the CDTA (Cryopreservation, Distribution, Typage et Archivage animal; Orléans, France). CD4cre x $Rorc$ flox, $Asc^{-/-}$, $Ice^{-/-}$, $Il-1b^{-/-}$ and $Il-18^{-/-}$ mice were kindly provided by Pr Ryffel. RORc $^{-/-}$ were purchased from Jackson laboratories (Bar Harbor, USA) and bred in house. All animals were bred and maintained according to both the FELASA and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, France). Female animals between 6 and 10 weeks of age were used in experiments.

To induce subcutaneous tumor formation, $3 \cdot 10^5$ B16-F10 melanoma cells, LLC1 lung cancer cells, and TC1 lung cancer cells were inoculated. Cell lines from ATCC were cultured at 37°C under 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 10% (vol/vol) Fetal Calf Serum supplemented with Penicillin-Streptomycin/Amphotericin B, and 4 mM of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES). Tumor size was routinely monitored every 3 days by means of a caliper. To induced tumor lung invasion, $2 \cdot 10^5$ B16-OVA melanoma cells (Sigma Aldrich) were injected intravenously. Lung tumor foci were enumerated 13 days after injection.

Treatments with blocking anti-bodies (Supplementary Table S1) were performed through intra peritoneal way 3 times a week with 200µg: anti-IL-4 (clone 11B11), anti-CD8 (clone YTS169.4), anti-NK1.1 (clone PK136), anti-CD25 (clone PC-61.5.3) or IgG1 (clone MOPC-21). For

immunotherapy, mice received anti-PD-1 mAb (200µg/mouse; clone 29F.1A12) or its isotype control (clone 2A3). Liposome chlodronate macrophage inhibitor was used at 1mg/mouse and MCC950 NLRP3 inhibitor (Merck) at 30 µg/mouse were injected ip twice a week, digoxine ROR γ t inhibitor (ref 4583, Tocris, R and D system) was used at 20µg/mouse every day. Tamoxifen (4 mg/mouse, ref 13258, Bertin Bioreagent) was diluted in sunflower oil and given every day during 5 days through oral gavage, as was pure oil as its control.

T Cell Purification and *in vitro* Differentiation

Mouse cells were cultured in RPMI-1640 Medium with 10% (vol/vol) Fetal Calf Serum supplemented with MEM non-essential amino acids (MEM-NEAA), sodium pyruvate, PSA, and 4 mM of HEPES.

Mouse naive CD4⁺T cells (CD4⁺CD44⁻) obtained from spleens and lymph nodes of mice were purified thanks to MACS Cell Separation system (naïve CD4T Cell isolation kit, Miltenyi Biotec). The purity of the isolated naive T-cell population routinely exceeded 95%. Naive CD4⁺ T cells were stimulated with plate-bound antibodies against CD3 (145-2C11, 2 mg/ml) and CD28 (PV-1, 2 mg/ml) in the presence of 10 ng/ml of IL-12, anti-IL-4 antibody (11B11, BioXcell) for Th1; 10 ng/ml of IL-4, anti-IFN- γ antibody(XMG1.2, BioXcell) for Th2; 4 ng/ml of TGF- β , anti-IL-4 and anti-IFN- γ antibodies for Treg; 2 ng/ml of TGF- β ; 20 ng/ml of IL-6 and IL-1 β and 25 ng/ml of IL-23 for pTh17 and with 20 ng/ml of IL-6 and 2ng/ml of TGF β for Th17r differentiation,. Cytokines were from Miltenyi Biotec. Cells were cultured in RPMI-1640 Medium with 10% (vol/vol) Fetal Calf Serum supplemented with MEM non-essential amino acids (MEM-NEAA), sodium pyruvate, PSA, and 4 mM of HEPES. When it is precised in the text, cells were pre-treated for 1 hour before stimulation with Z-VAD (50µM, Selleckchem), Z-IETD-FMK (50µM, Selleckchem), MCC950 (10µM, Merck), Anakinra (300nM, MedChemExpress), SIS3 (10µM,

Merck), LY294002 (325 nM, Selleckchem), SB203580 (10 μ M, Selleckchem), Y27632 (10 μ M, Selleckchem), JNK Inhibitor II (10 μ M, Merck), or recombinant mouse IFN γ (research grade, Miltenyi).

Immunofluorescence (IF) and in situ Proximity Ligation Assay (PLA)

1 \times 10⁶ cells were washed, fixed for 10 min at RT with 4% PFA and permeabilized for 10 min on ice with methanol 100% glacial for 30 min. Non-specific binding was blocked at RT for 1h with 5% Fetal Bovin Serum, 0.3% Triton X100 in PBS (for IF) inducing membrane permeabilisation. Samples were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (1/100 anti-NLRP3/NALP3, mAb, Cryo-2, Adipogen; 1/50 Smad3 Antibody, Cell Signaling Technology; 1/100 phospho-SMAD3 (Ser423/425), 1/50 Smad3 Antibody, cell Signaling Technology; 1/50 anti-TGF β Receptor Antibody type I, Sigma Aldrich; 1/100 Cell Signaling; IRF-4 (D9P5H) rabbit mAb, Cell Signaling Technology; mouse IgG Isotype Control, ThermoFisher Scientific; Rabbit IgG Isotype Control, ThermoFisher Scientific) diluted in 1% BSA, 0.3% Triton X100 in PBS. Cells were then washed twice with 0.05% Tween 20 in PBS (PBS-Tween).

For IF, cells were incubated for 1h at RT with the secondary antibody diluted in the same buffer. Cells were washed twice with PBS-Tween solution and two times with ultrapure water.

For PLA, cells were incubated for 30 min at 37 °C with the appropriate probes (Duolink[®] In Situ PLA[®] Probe Anti-Rabbit PLUS and Anti-Mouse MINUS; Sigma Aldrich) and 1h40 with the polymerase solution according to recommendations.

For both experiments, stained cells were dropped off on microscopy slides (Superfrost Ultra Plus[®], ThermoFisher Scientific) and incubated at RT until water evaporation. Slides were

mounted with a drop of Mounting Medium containing DAPI (Molecular Probes). Slides were imaged with Axio Imager – M2 microscope (Zeiss). Images were analyzed by Zen software.

Quantitative PCR Analysis

Total RNA from T cells was extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 300 ng of RNA was reverse-transcribed into cDNA by M-MLV reverse transcriptase, Random Primers, and RNaseOUT inhibitor (Invitrogen). cDNAs were quantified by real-time PCR with a SYBR Green Real-time PCR kit (Applied Biosystems) on a Fast7500 detection system (Applied Biosystems, France). Relative mRNA levels were determined with the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method relative to β actin.

Cytokine, ATP, AMP and glycolysis Measurement

Secreted cytokines were measured by ELISA for mouse IL-1 β , IFN γ , and GM-CSF (BD Biosciences) according to manufacturers' instructions.

For ATP/AMP measurement, cells were placed in RPMI medium without phenol red (Seahorse XF RPMI, Agilent), supplemented with 10 mM Glucose (Seahorse XF Glucose, Agilent), 1mM Pyruvate (Seahorse XF Pyruvate, Agilent) and 2mM L-glutamine (Seahorse XF L Glutamine, Agilent). The Promega CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability assay was used to measure ATP and AMP.

For glycolysis measurement, cells were placed in RPMI medium without phenol red (Seahorse XF RPMI, Agilent), supplemented with 10 mM Glucose (Seahorse XF Glucose, Agilent), 1mM Pyruvate (Seahorse XF Pyruvate, Agilent) and 2mM L-glutamine (Seahorse XF L Glutamine, Agilent). Cells were seeded in 96-well test cartridge (Seahorse XF sensor Cartridge, Agilent) and centrifuged. Rotenone/Antimycin and 2-DG were added to the cartridge according to

recommendations. The cartridge was analyzed through Seahorse XFe96 Analyzer via the Seahorse Glycolytic Rate Assay.

Flow Cytometry

Stained samples were acquired on a Fortessa cytometer (BD) and analyses were performed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Samples were studied after the times and treatments indicated in the figures. Samples were cut into small pieces (<0.5mm) followed by dissociation using the Tumor dissociation kit and the gentleMACS octo dissociator (Miltenyi). Lysates were filtered on 70µm strainers and washed with PBS. Lysate CD-45+ cells were then enriched using CD45 TIL Microbeads mouse and magnetic columns (Miltenyi Biotec). After centrifugation, cell suspensions were incubated for 3 hours at 37°c in RPMI supplemented with 0.2% of a stimulation cocktail (Cell Stimulation Cocktail plus protein transport inhibitors ref 00-4975-93 eBioscience). The cells were then labeled with antibodies for membrane proteins in Flow Cytometry Staining Buffer (ref 00-422-26 eBioscience). The antibodies used were CD4-V500 (clone RM4-5, BD), CD4-BUV395 (GK1.5, BD), CD45-BUV395 (30-F11, BD), CD45-Viogreen (REA737, Miltenyi), CD8a-PercP-Cy5.5 (53-6.7, BD), CD8a-BUV805 (53-6.7, BD), CXCR3-APC (REA724, Miltenyi), CCR4-PE (2G12, Biolegend), CCR6-BV605 (29-2L17, Biolegend), CD25-AF700 (PC61, Biolegend), CD127-BV421 (BD), CD39-PE-Cy7 (24DMS1, eBioscience), CD73-PE (TY/11.8, Biolegend), and CD45.2-FITC (104, BD). We followed with fixation and permeabilisation of the cells using the FoxP3 staining buffer set from Miltenyi and pursued with intracellular stainings. The antibodies used were IFNγ-BV421 (XMG1.2, Biolegend), Foxp3-PercP-Cy55 (FJK-16s, eBioscience), RORgt-APC (AFKJS-9, eBioscience), Ki67-BV605 (16A8, Biolegend), Granzyme B-FITC (REA226, Miltenyi), TNFa-BV510 (MP6-XT22, Biolegend)

and STAT1pY701-PE (REA159, Miltenyi). All staining include a viability staining (Fixable Viability stain, BD). Cell sorting was performed with ARIAII device (BD).

RNA-sequencing

Total RNA from T cells was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). rRNA were removed using the Ribo-zero rRNA Removal Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). 100 ng of rRNA-depleted RNA was used for the library preparation using the TruSeq Stranded Total RNA Library Prep kit (Illumina) following the manufacturer's instructions. RNA sequencing was performed on NextSeq device (Illumina). RNA-seq libraries were sequenced with paired-end 75 bp reads. FASTQ files were mapped by using BWA (mm10 version of Mus Musculus genome) for Illumina. The analysis was performed by using TopHat for Illumina. Generated files were processed with Cufflinks software to obtain annotated expressed genes in each studied subtype. Then, differential expression between the samples was analyzed with Cuffdiff.

Killing assay and Immunosuppressive assay

To evaluate Th17 cytotoxicity, killing assays were performed either with Th17 cells differentiated from OTII or OTII*Nlrp3*^{-/-} naïve CD4 T cells. These cells were seeded in 24 well-plates with B16-OVA cells through a decreasing ratio of B16-OVA/Th17 for 24 hours. Cell viability was evaluated by cytometry after Viab and CD4 stainings.

To evaluate CD8 cytotoxicity, killing assays were performed either with CD8 T cells isolated from B16F10 tumors of or from CD4Cre x *Nlrp3*^{flox} mice and their littermate controls. Cells

were seeded in 24 well-plates with B16F10 cells at a 1/1 ratio. Cell death was evaluated by cytometry through an Annexin V/DAPI staining.

Th17 activity was evaluated through immunosuppressive assays. Total CD8 cells were obtained from spleens and lymph nodes of OTI mice after isolation using CD8a (Ly-2) Microbeads (Miltenyi). CD8 cells were seeded with increased quantity of Th17 *in vitro* differentiated from OTII or OTII NLRP3^{-/-} naïve CD4 T cells in CD3/CD28 coated plates, in complete RPMI supplemented with SIINFEKL peptide (2µg/ml). After 24h hours culture, cells were harvested and cytokine production was analyzed by cytometry.

Chromatin Immunoprecipitation Assay

Chromatin Shearing was performed with the truChIP™ Chromatin Shearing Kit (Covaris) using the Focused-Ultrasonicator M220 device (Covaris). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed with the ChIP-IT kit (Active Motif Europe, Rixensart, Belgium) according to manufacturer's instructions with 1 µg of pSMAD3 antibody (Ser423/425, C25A9, Cell Signaling Technology), or 1 µg of rabbit negative control immunoglobulin G (IgG). DNA precipitation was evaluated by qPCR using the following primers: *Ifng* 5'ccttgggtgtgttgagttaa3' and 5'aaaaagccaatgtggtgagg3', *csf2* 5'ggctactcccatttgactgc3' and 5'cagcctcagagaccaggta3', *Tnfa* 5'agggtctgggcatagaact3' and 5'ccaccagctcttctgtctac3'.

Quantification and Statistical Analysis

Results are shown as mean ± SD or SEM, and data sets was compared using Mann-Whitney test (test group *versus* control group) or 2-way ANOVA when appropriate. Differences in tumor foci numbers were assessed using Kruskal–Wallis test according to group numbers.

Statistical calculations were done using GraphPad Prism. All p values were two-tailed. A $p < 0.05$ was considered statistically significant for all experiments.

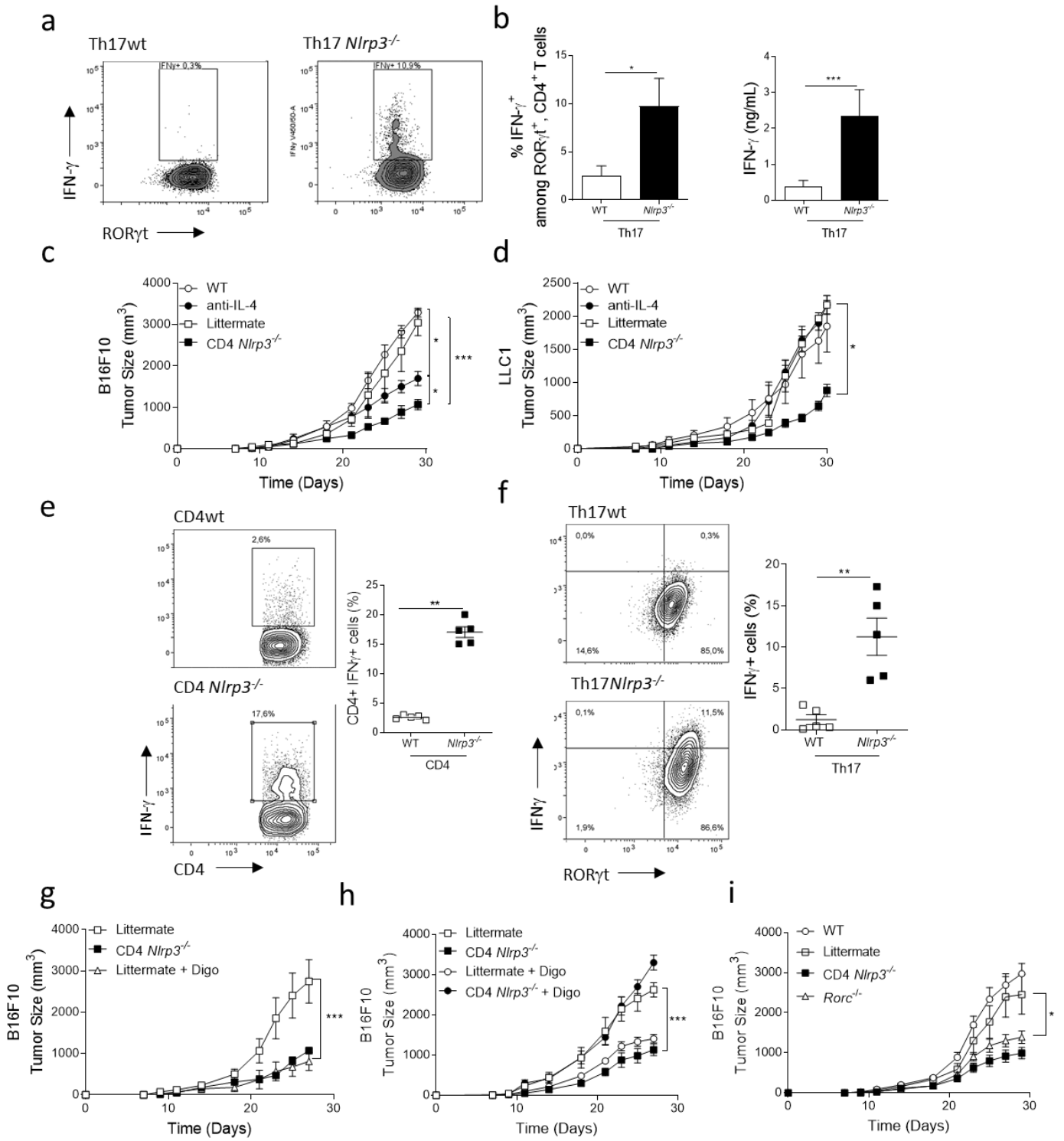


Fig1. NLRP3 is involved in Th17 differentiation.

a. IFN γ production detected by cytometry in Th17 differentiated *in vitro* for 72h from naïve CD4 T cells isolated from CD4^{Nlrp3^{-/-}} (Th17^{Nlrp3^{-/-}}) mice and their littermate controls (Th17wt).

b. IFN γ quantification detected by ELISA in the same samples as in (a). **c,d.** Tumor growth (n=5) of B16F10 (a) and LLC1 (b) in C57Bl6 WT treated or not with IL-4 blocking antibody (anti-IL-4), and in CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice and their littermate control. **e-f.** IFN γ production detected by cytometry in CD4 T cells (e) and in Th17 cells (CCR6⁺ ROR γ t⁺Foxp3⁻) (f) from B16F10 tumors. **h-i.** B16F10 tumor growth (n=5) in CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice and their controls treated or not with Digoxin (Digo) (h and i) and in C57Bl6 WT, *Rorc*^{-/-}, CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice and their controls (j). Data shown are representative of 3 *in vivo* independent experiments or 5 *in vitro* independent experiments. Statistical significance was determined by 2-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (c,d, g-i) and Mann-Whitney test. * <0.05, **<0.01, ***<0.005.

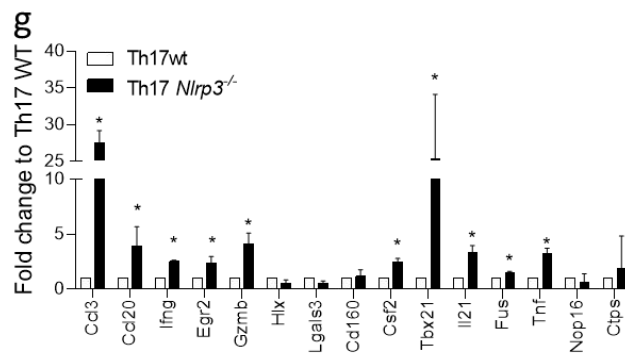
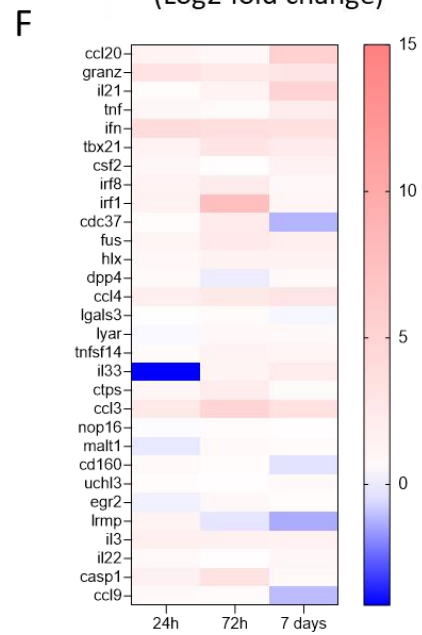
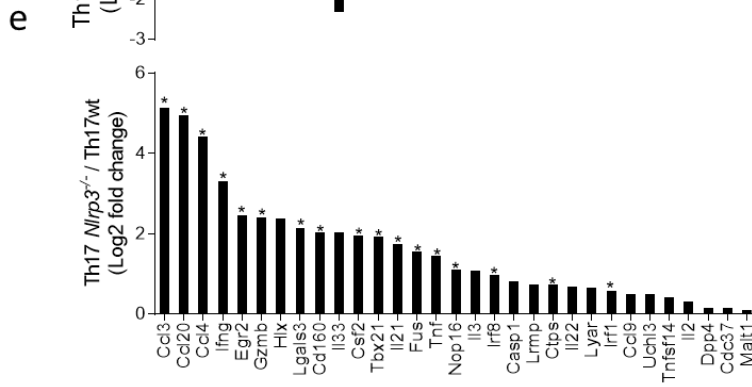
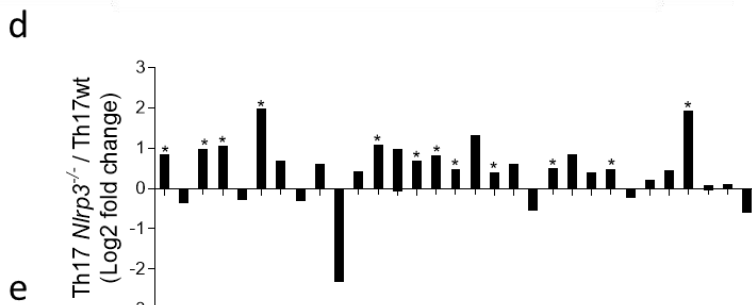
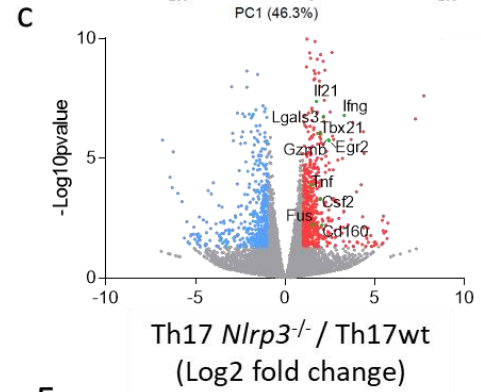
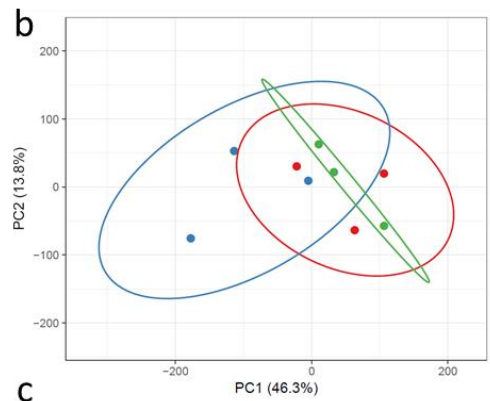
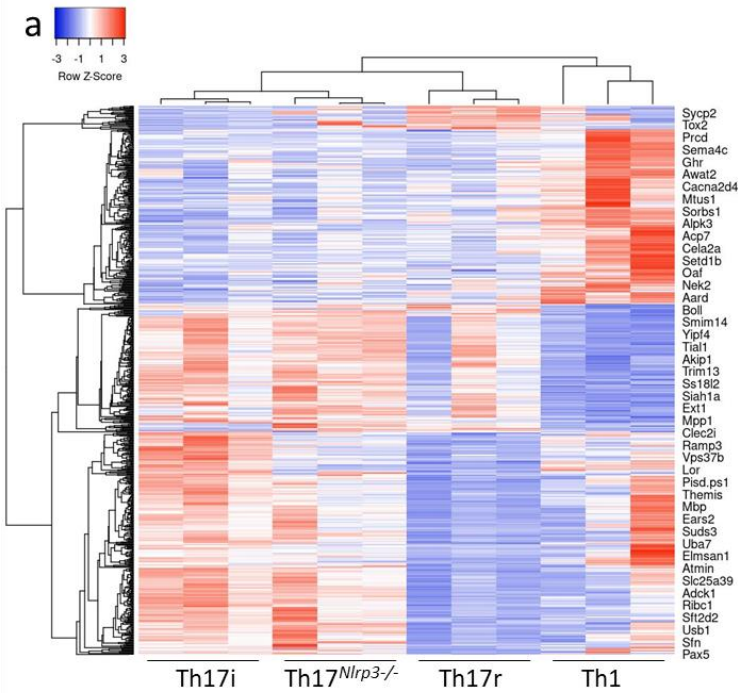


Fig2. NLRP3 deficiency favors a Th17 inflammatory profile.

a-e. *In vitro* differentiated WT Th1 (Th1), WT inflammatory Th17 (Th17i) or regulator Th17 (Th17r) et *Nlrp3*^{-/-} regulator Th17 (Th17^{*Nlrp3*^{-/-}}) for 72h (a-c,e) or 24h (d). **a.** Heatmap representing hierarchical clustering of RNASeq data **b.** Principal component analysis (PCA) of the same data as in (a). **c.** Volcano plot of the distribution of differentially expressed genes of the same data as in (a), mapping the up regulated genes in red, downregulated genes in blue and inflammatory gene signature in green. **d and e.** Differential expression of genes signing the inflammatory profile of Th17 cells in RNASeq data performed after 24h (d) and 72h (e) of *in vitro* differentiation. **f.** Heat map representation of the differential expression of the inflammatory profile of Th17 cells evaluated by RT-qPCR during a kinetic 24h, 72h and 7 days of *in vitro* differentiation. **g.** Differential expression evaluated by RT-qPCR of the inflammatory profile of Th17 cells isolated from B16F10 tumors of CD4^{*Nlrp3*^{-/-}} mice and their controls as CD4+CCR6+Foxp3- cells. Data shown are pool of 3 independent experiments. (a) Unsupervised hierarchical clustering of samples was performed by using Gene Cluster 3.0 software and viewed with Treeview viewer. Genes were normalized and mean centered. The hierarchical clustering was performed using Correlation measure and complete linkage analysis. (d-e) Cuffdiff analysis, g Statistical significance was determined by 2-way ANOVA test. Stars mean there were significant differences.

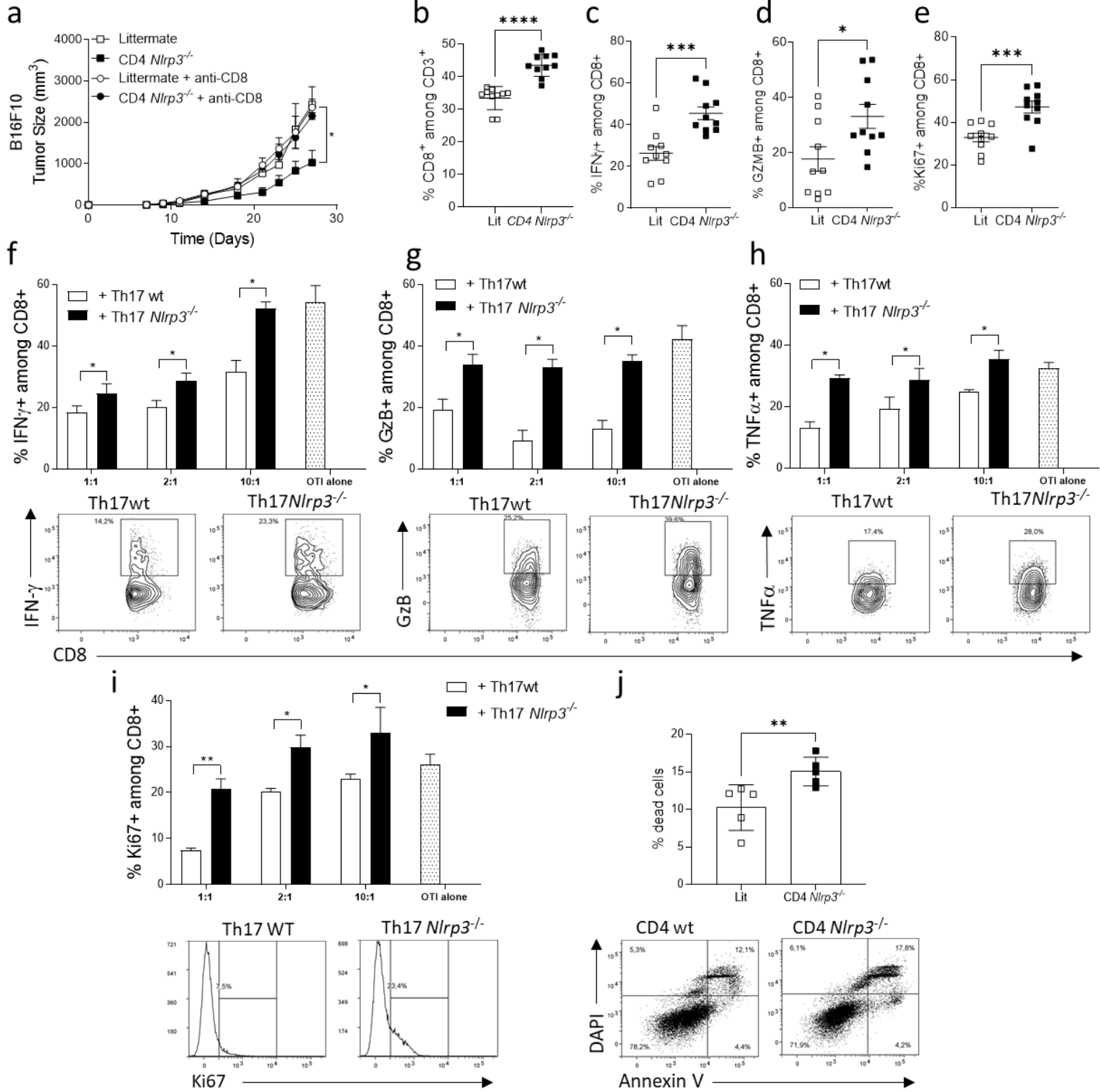


Fig3. Th17 deficient for NLRP3 lose their immunosuppressive functions.

a-e. B16F10 tumor cells were injected subcutaneously into CD4^{Nlrp3^{-/-}} and their littermate controls (Lit) with or without anti-CD8a blocking antibody. **a.** Tumor growth. **b-e.** Analysis of CD8 TILs by flow cytometry. **b.** CD8 frequency, **c.** IFN γ production, **d.** Granzyme B, **e.** Proliferation assessed by Ki67 staining. **f-i.** Naïve CD4 T cells were isolated from CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice and their littermate controls and differentiated in regulator Th17 for 72h (Th17wt, Th17^{Nlrp3^{-/-}}). CD8 T lymphocytes were isolated from OTI mice and culture alone or with Th17 according to an increasing CD8:Th17 ratio (1:1, 2:1, 10:1). The production of IFN γ , **f.**, Granzyme B, **g.**, TNF α , **h.**, and proliferation, **i.**, were evaluated by flow cytometry. **j.** CD8 T cells were isolated from B16F10 tumors of CD4^{Nlrp3^{-/-}} and their littermate controls and co-cultured with B16F10 for 24h. B16F10 mortality rate was assessed by flow cytometry on CD45⁻ cells. Data shown are representative of 3 *in vivo* independent experiments or 5 *in vitro* independent experiments. Statistical significance was determined by 2-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (a-c, h, i) and Mann-Whitney test. * <0.05, **<0.01, ***<0.005.

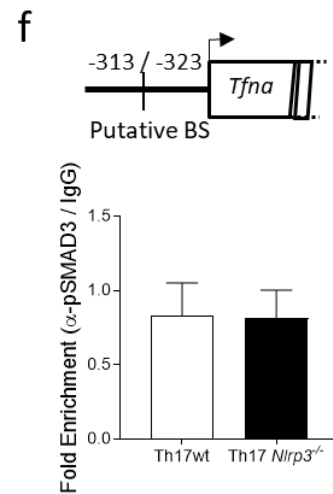
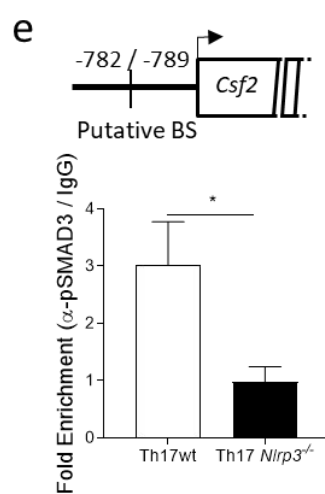
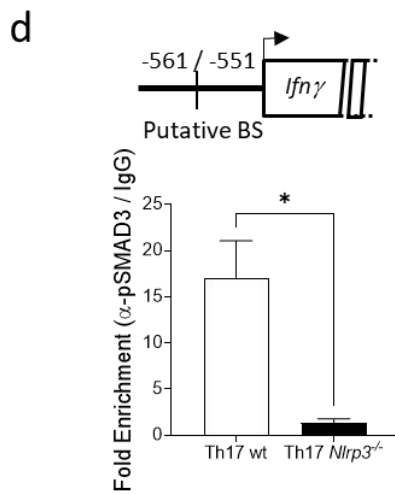
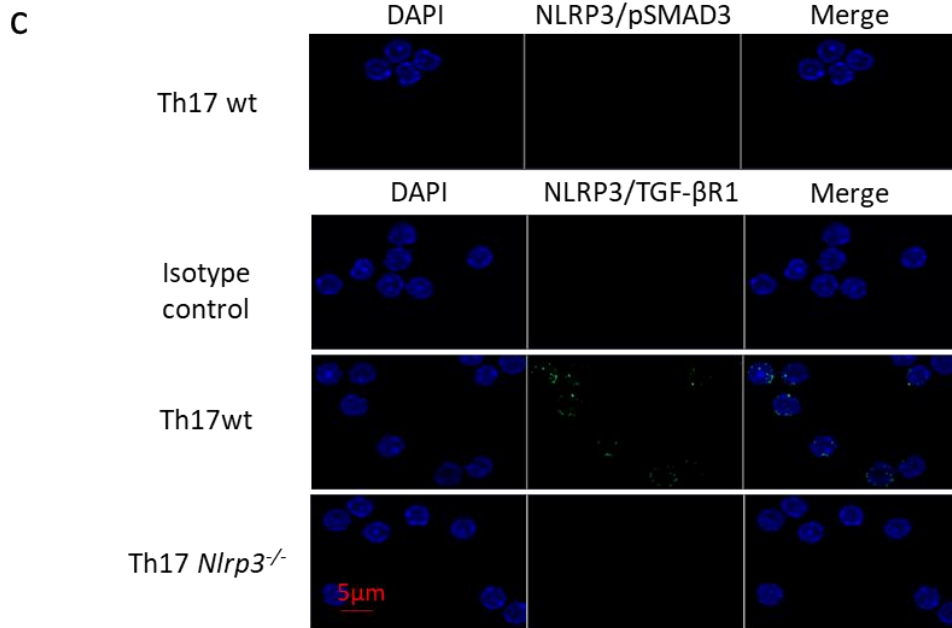
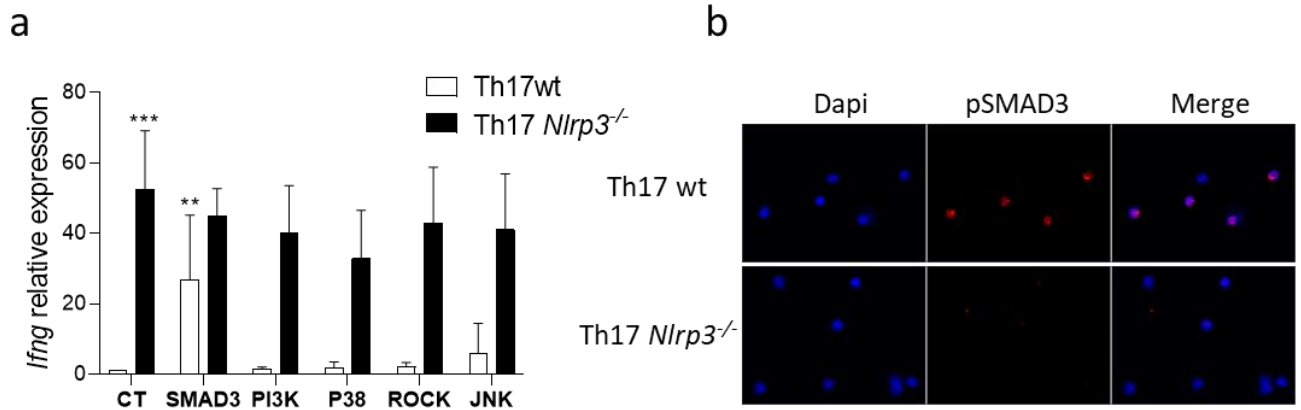


Fig4. NLRP3 non-canonical functions are involved in Th17 cells.

a. *Ifn γ* mRNA level in naïve CD4^{Nlrp3^{-/-}} deficient mice (Th17^{Nlrp3^{-/-}}) and their littermate controls (Th17wt) after 24h of *in vitro* polarization, treated or not (NT) with pharmacological inhibitors of SMAD3 (SIS3), PI3K (LY294002), P38 (SB203580), ROCK (Y27632) or JNK (JNK Inhibitor II). **b.** Immunofluorescent staining of pSMAD3 in Th17 cells differentiated for 1h *in vitro* from naïve CD4^{Nlrp3^{-/-}} deficient mice (Th17^{Nlrp3^{-/-}}) and their littermate controls (Th17wt). **c.** Proximity of NLRP3 and pSMAD3 (upper) and NLRP3 and TGF- β R1 (lower) by Proximity Ligation Assay in Th17 cells differentiated for 1h *in vitro* from naïve CD4^{Nlrp3^{-/-}} deficient mice (Th17^{Nlrp3^{-/-}}) and their littermate controls (Th17wt). **d-f.** pSMAD3 enrichment on pSMAD3 putative binding sites of *Ifn γ* (**d**), *csf2* (**e**) and *tnfa* (**f**) promoters by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay in Th17 cells differentiated for 1h *in vitro* from naïve naïve CD4^{Nlrp3^{-/-}} deficient mice (Th17^{Nlrp3^{-/-}}) and their littermate controls (Th17wt). Data shown are representative of 4 to 5 *in vitro* independent experiments. Statistical significance was determined by Mann-Whitney test. * <0.05, **<0.01, ***<0.005.

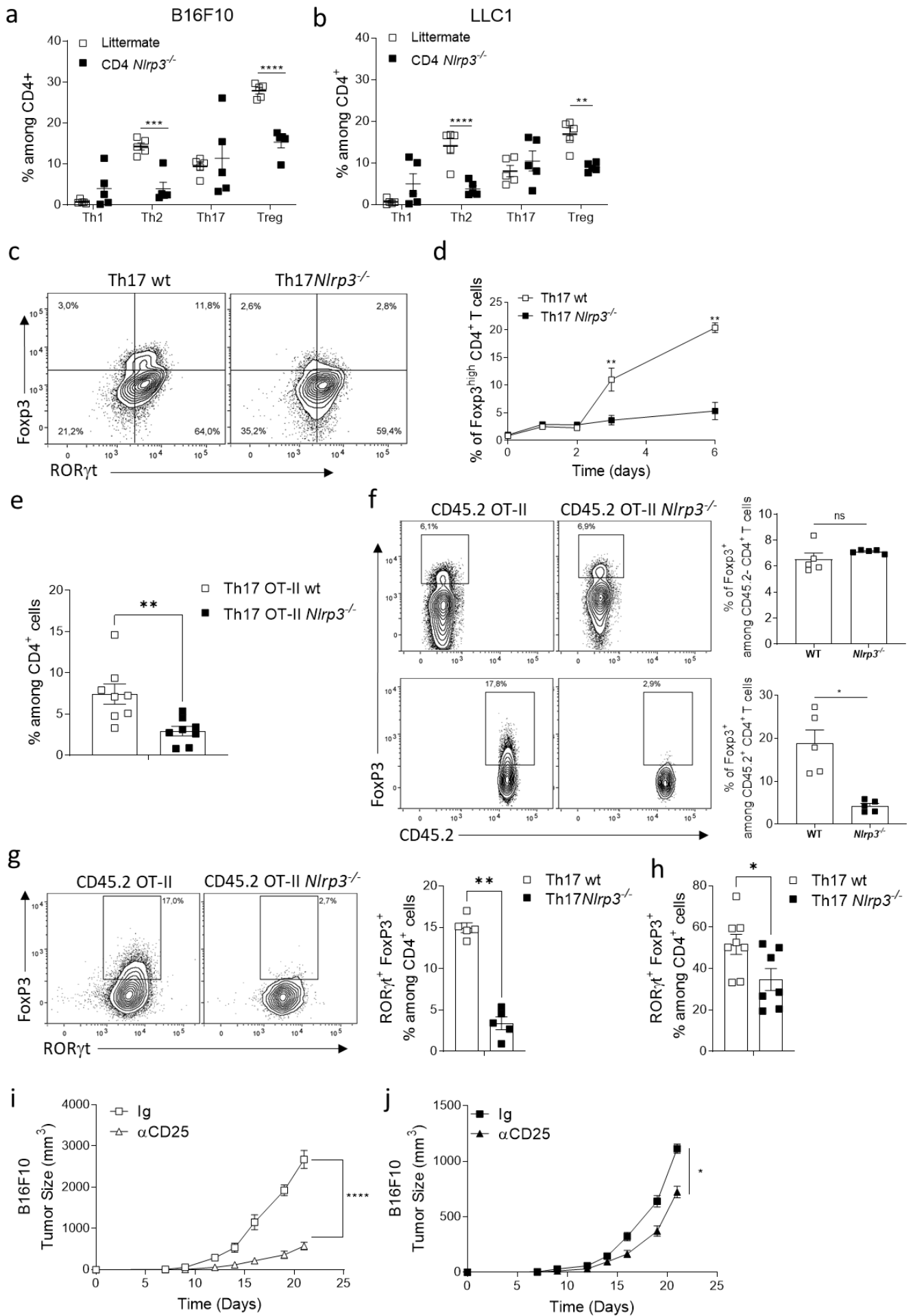


Fig5. NLRP3 non-canonical functions are involved in Th17 cells.

a, b. Proportion of CD4 T cell subsets (Th1, Th2, Th17, Treg) in B16-F10 (a) and LLC1 (b) subcutaneously injected tumors of CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice and their littermate controls. **c, d.** Naive CD4 T cells isolated from CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice and their littermate controls were differentiated *in vitro* into Th17. ROR γ t and Foxp3 expression was detected by cytometry during a kinetic from day 0, 1, 2, 3 (c) and day 6 (d). **e-h.** Th17 cells were differentiated from naïve CD4 T cells isolated from OTII or *Nlrp3* deficient, CD45.2 mice. These cells were transferred into WT CD45.1 mice (e-g) or into CD4^{Rorc^{-/-}} mice bearing B16OVA lung tumors (h). 48h later frequency of Tregs (Foxp3+) cells present in the lung were analyzed by cytometry among CD4 T cells (e), among CD45.2+ and CD45.2- cells (f), among ROR γ t expressing cells (g, h). **i, j.** B16F10 melanoma subcutaneously injected tumor growth in CD4^{Nlrp3^{-/-}} mice (i) and their littermate controls (j) and treated or not with anti-CD25 blocking antibody. The data are representative of 3 independent experiments. Statistical significance was determined by Mann-Whitney test (a-h) and 2-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (i, j) * <0.05, **<0.01, ***<0.005.

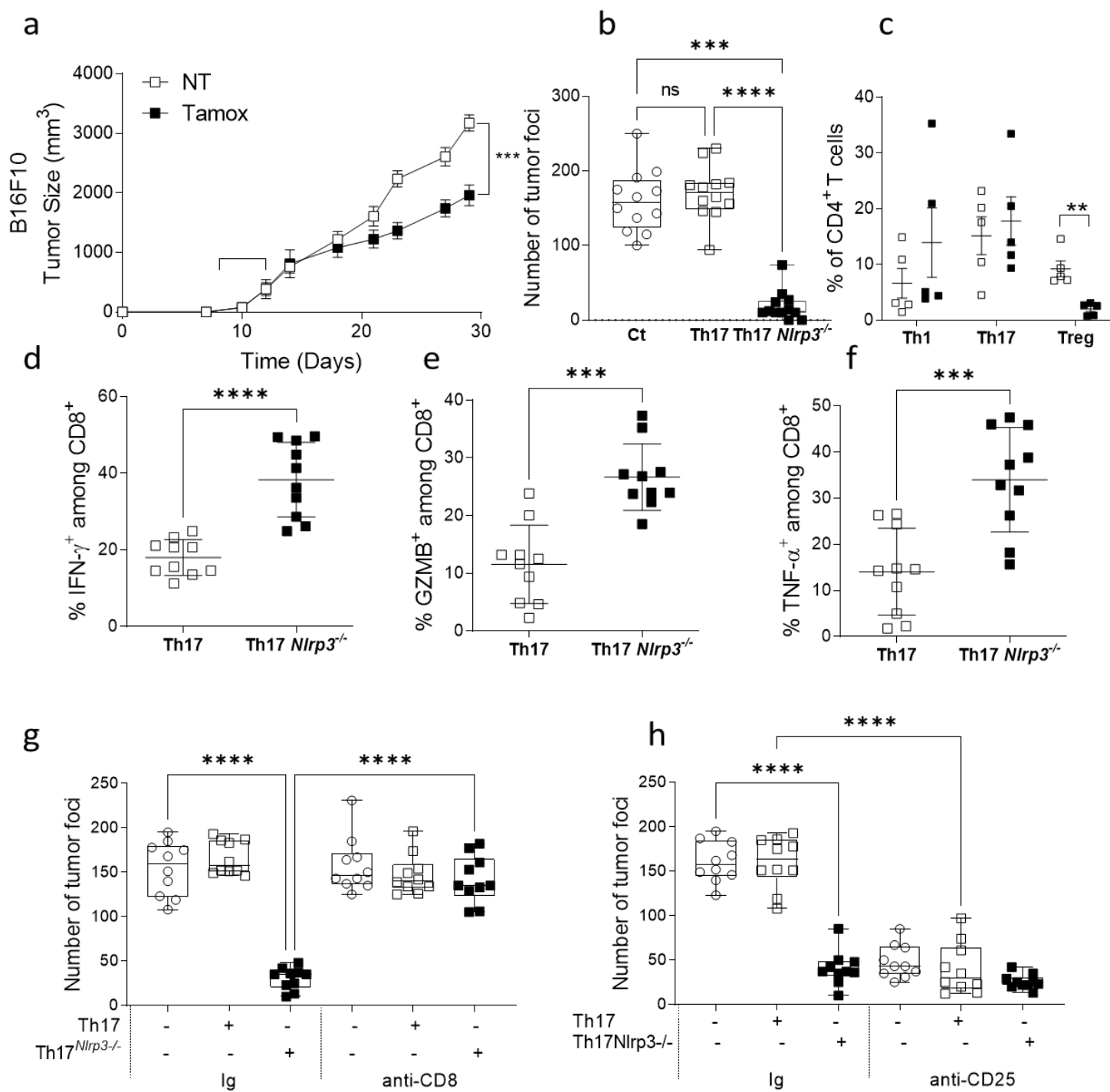
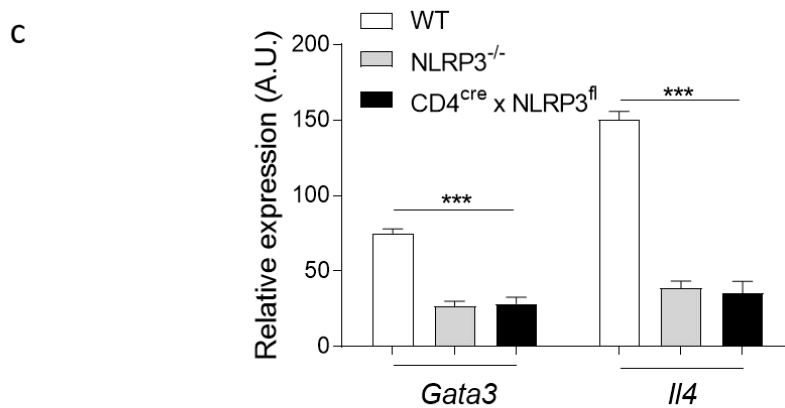
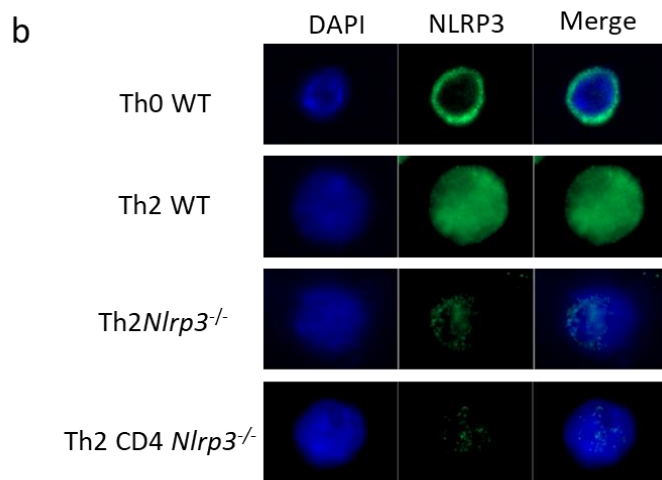
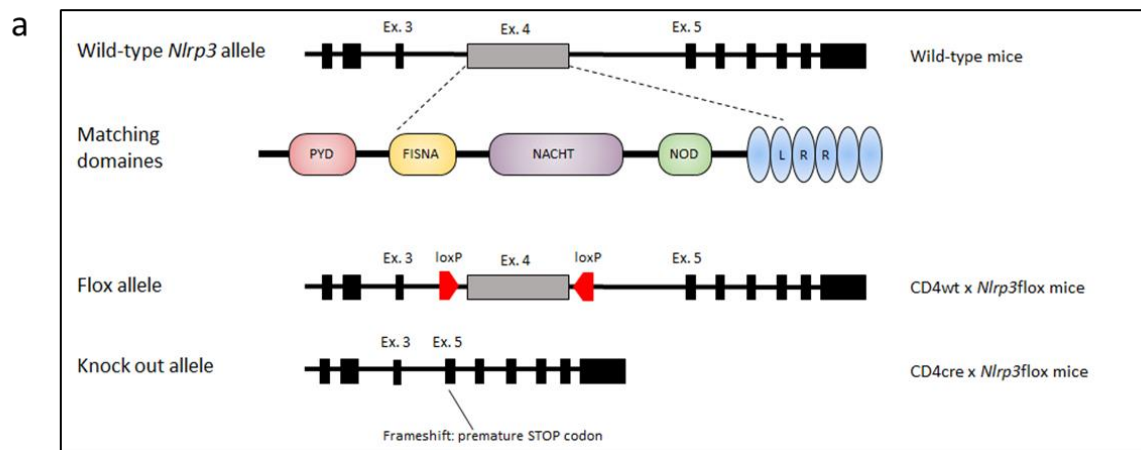


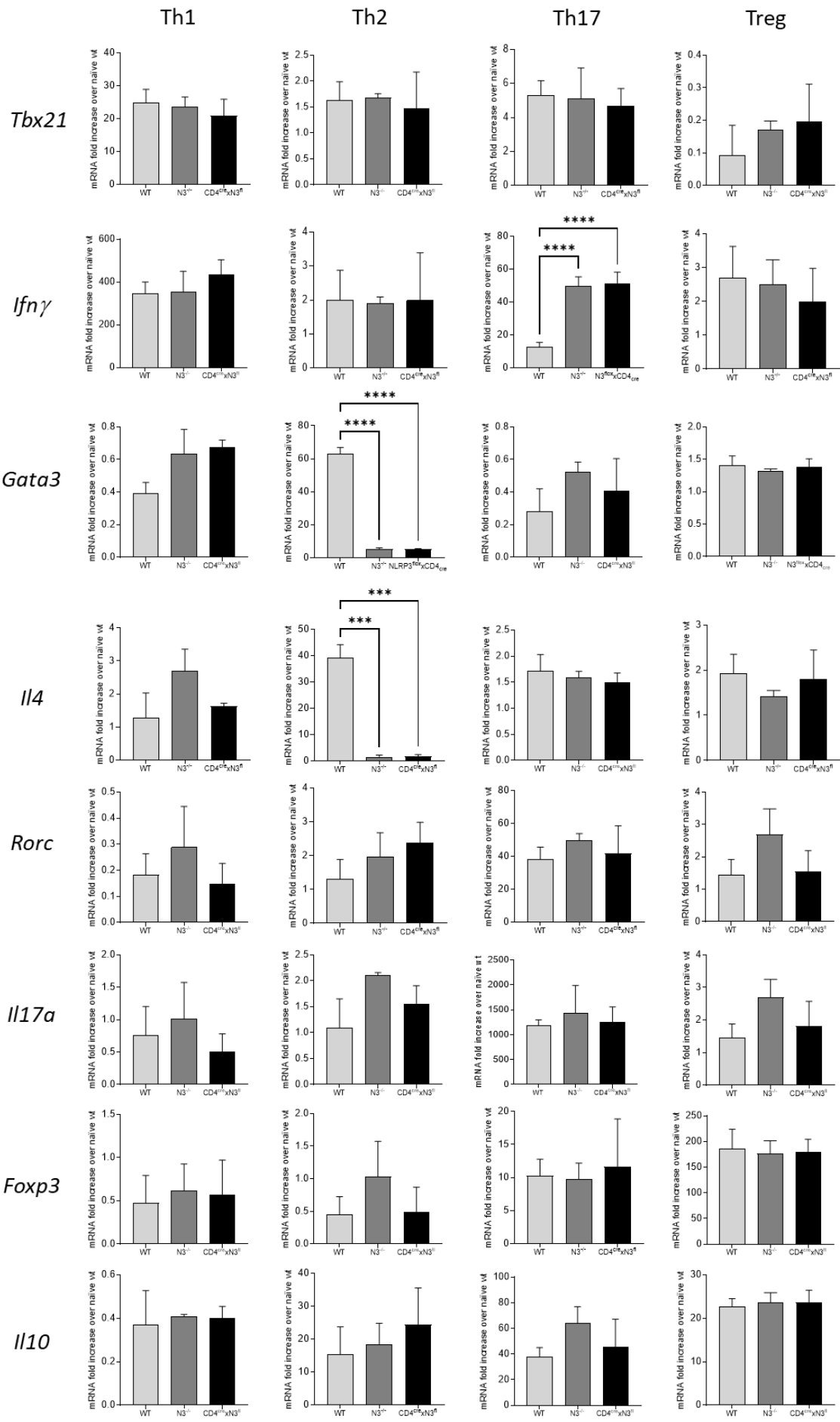
Fig6. Targeting NLRP3 in Th17 cells has a therapeutic value.

a, Tumor growth of subcutaneously injected B16F10 melanoma in CD4CreERT2*Nlrp3^{fl/fl}* mice treated or not with Tamoxifen (square brackets correspond to the days when the Tamoxifen was given to mice). **b**, B16OVA lung tumor foci 13 days after OTII Th17 (Th17) or OTII Th17^{*Nlrp3*^{-/-}} (Th17^{*Nlrp3*^{-/-}}) cell intravenous injection. **c**. Proportion of CD4 T cell subsets (Th1, Th17, Treg) in lungs of B16OVA bearing mice 13 days after OTII Th17 (white squares) or OTII Th17^{*Nlrp3*^{-/-}} (black squares) cell intravenous injection. **d-f**. Analysis of CD8 from the lungs of mice from **b** by flow cytometry. **d**. IFN γ production, **e**. Granzyme B production **f**. TNF α production. **g, h**. B16OVA lung tumor foci in mice treated or not with OTII Th17 (Th17) or OTII Th17^{*Nlrp3*^{-/-}} (Th17^{*Nlrp3*^{-/-}}) cells in combination or not with (**g**) anti-CD8 blocking antibody or (**h**) anti-CD25 blocking antibody. The data are representative of 3 independent experiments. Statistical significance was determined by 2-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (a), Kruskal-Wallis (a, g, h) or Mann-Withney (c-f). * <0.05, **<0.01, ***<0.005.



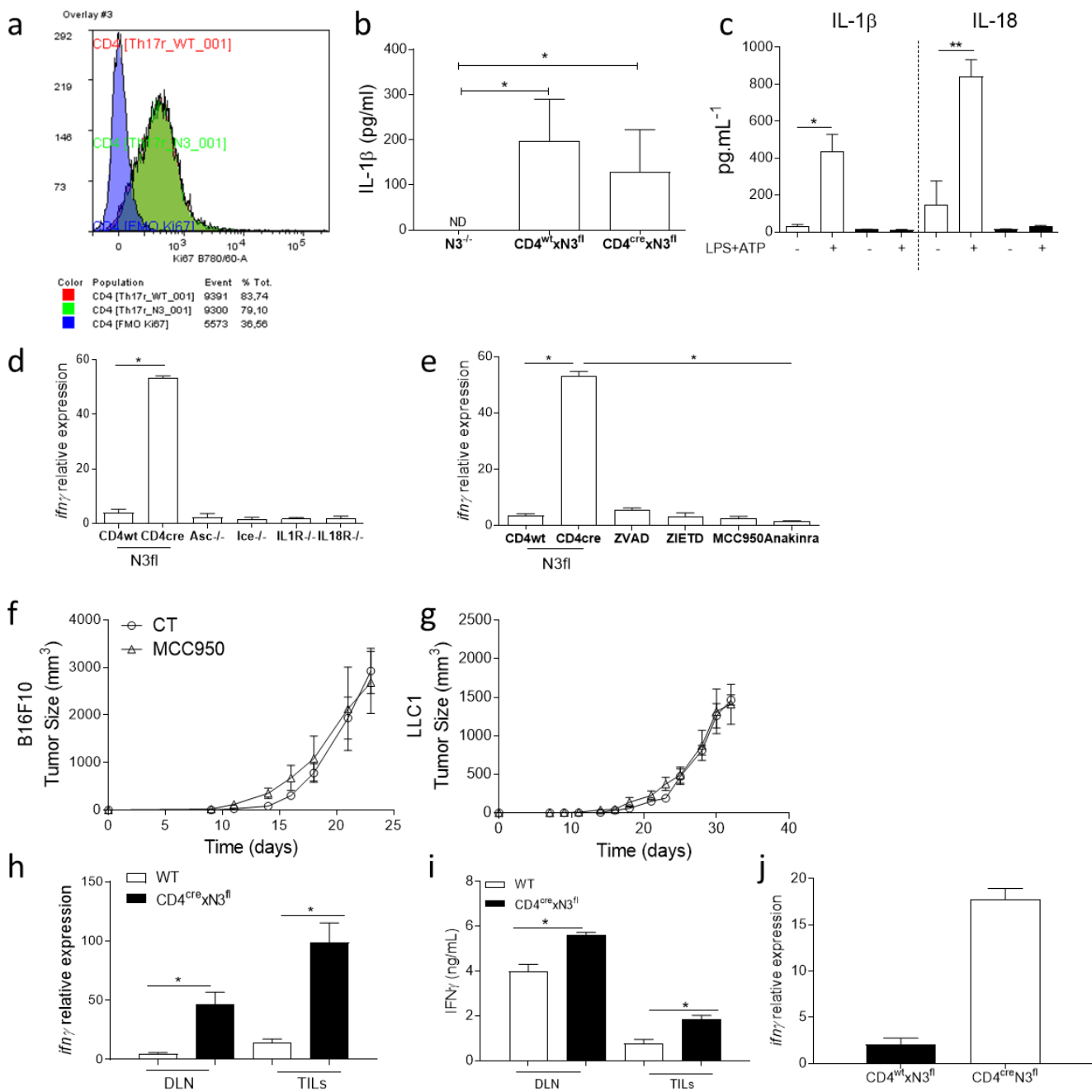
Extended Data Fig.1: Generation of CD4cre x *Nlrp3*^{fl} mouse and validation

a. Schematic of *Nlrp3* wild-type, floxed and knockout alleles. Lines=introns; closed boxes=exons; red arrowheads=loxP sites. **b.** Immunofluorescence microscopy images of WT, *Nlrp3*^{-/-} or CD4^{*Nlrp3*^{-/-}} Th2 cells after 24h of *in vitro* differentiation. Nucleus (blue) labeled with DAPI and NLRP3 (green). **c.** mRNA expression of *Gata3* and *il4* in WT, *Nlrp3*^{-/-} or CD4^{cre} *NLRP3*^{fl/fl} naïve T cells after 24h of *in vitro* Th2 differentiation. Statistical significance was determined by 1-way ANOVA (c) ***<0.005.



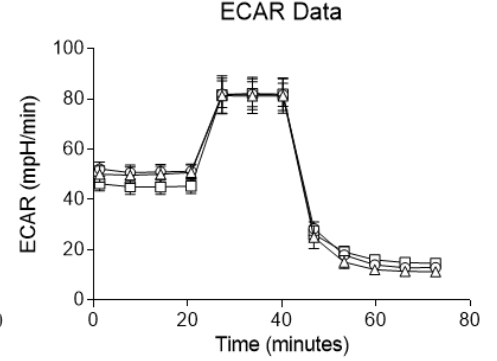
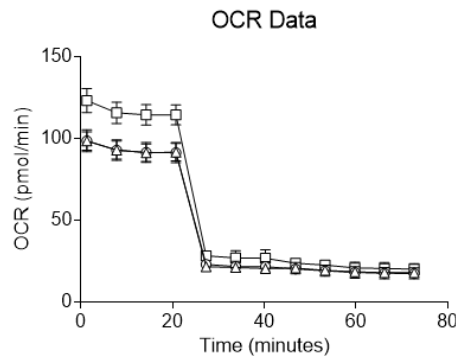
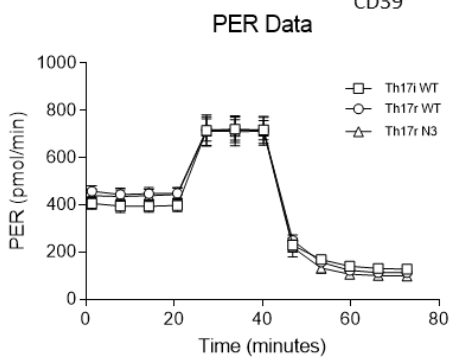
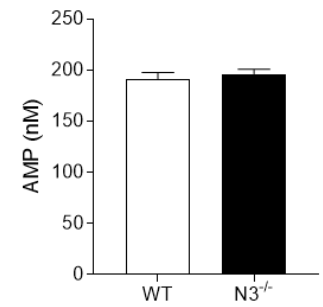
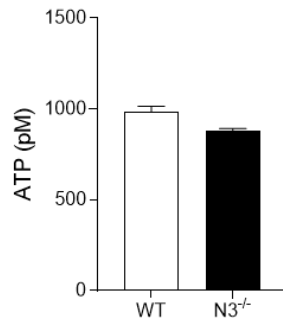
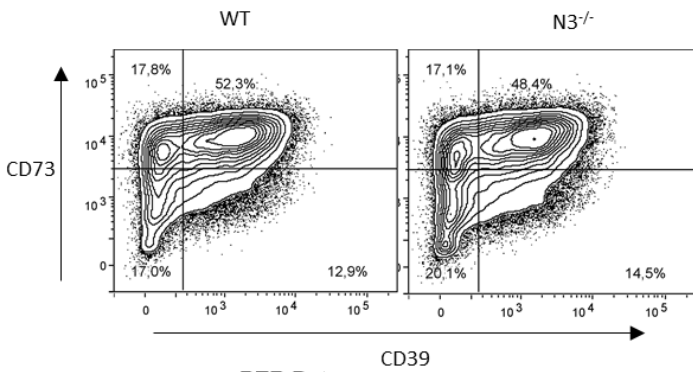
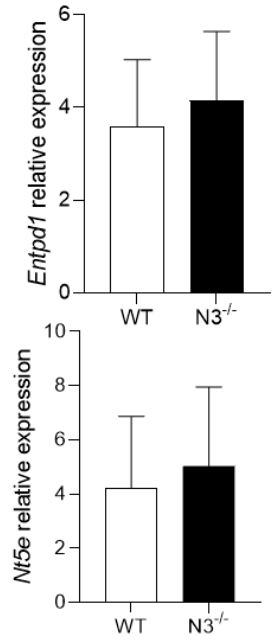
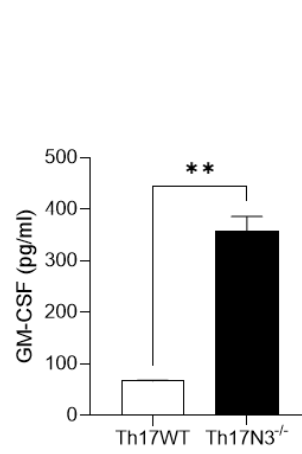
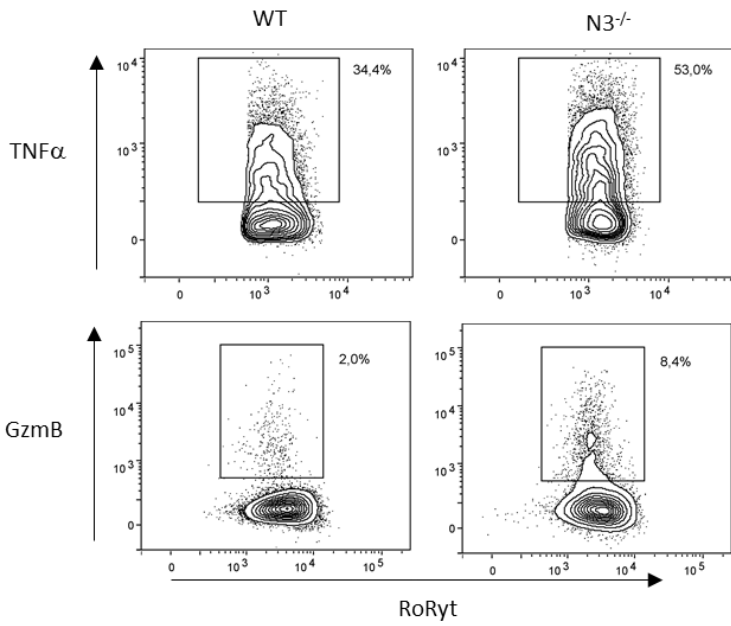
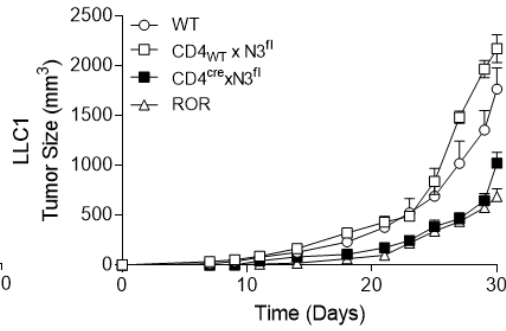
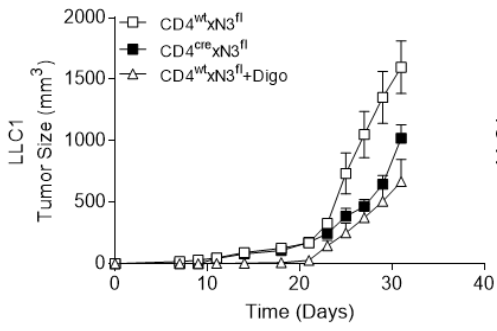
Extended Data Fig.2: Impact of *Nlrp3* deficiency on the expression of T helper subpopulations signature genes.

mRNA expression of **a. *Tbx21*** **b. *Ifny*** **c. *Gata3*** **d. *Il4*** **e. *Rorc*** **f. *Il17a*** **g. *Foxp3*** **h. *Il10*** measured in WT, NLRP3^{-/-} and CD4^{cre} NLRP3^{fl} naïve T cells after 24 hours of *in vitro* Th1, Th2, Th17 or Treg differentiation. Statistical significance was determined by 1-way ANOVA ***<0.005, ****<0.001.



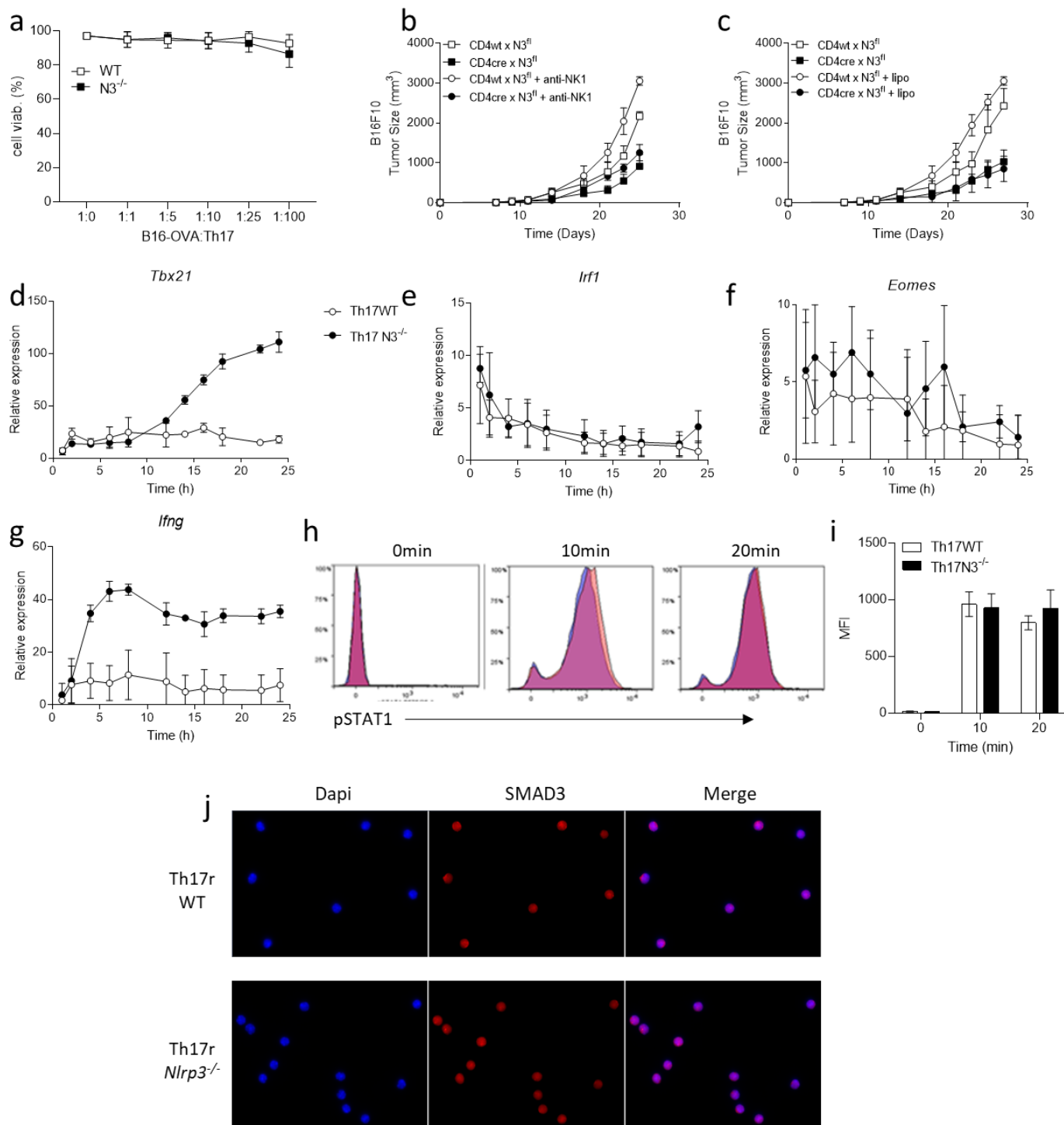
Extended Data Fig.3: NLRP3 inflammasome function is not involved in CD4 T cells.

a. Proportion of Ki67⁺ cells determined by flow cytometry on WT (red) or *Nlrp3*^{-/-} (green) naïve T cells after 72h of *in vitro* Th17 differentiation. The curves are superimposed **b.** IL-1 β produced in B16F10 tumors from *Nlrp3* deficient mice (*N3*^{-/-}), CD4wt x *N3*^{fl} and CD4cre x *N3*^{fl} mice evaluated by ELISA. **c.** IL-1 β and IL-18 production detected by ELISA in supernatant of macrophages (white) or Th17 cells (black) treated with LPS+ATP. **d** and **e.** *Ifng* mRNA relative expression in Th17 cells differentiated from wild type (WT), *Nlrp3* (*N3*^{-/-}), *Asc*, *Ice*, *il1ra*, and *il18r* deficient mice (c), or treated with inflammasome inhibitor (MCC950), caspase-1 inhibitor (ZVAD), caspase-8 inhibitor (ZIETD) or Anakinra (Anak). **f** and **g.** B16F10 (f) and LLC1 (g) tumor growth in wild type C57Bl6 mice treated or not with inflammasome inhibitor (MCC950). **h.** *Ifng* relative expression in CD4 T cells isolated from tumor draining lymph nodes (DLN) and from tumors of CD4wt x *N3*^{fl} (WT) and CD4cre x *N3*^{fl} mice. **i.** IFN γ production evaluated by ELISA in the supernatant of the cells isolated in (h) and restimulated over night with anti-CD3 and anti-CD28. **j.** *Ifng* relative expression in Th17 cells sorted from tumors of CD4wt x *N3*^{fl} and CD4cre x *N3*^{fl} mice by cytometry as CD4+CCR6+ROR γ t+Foxp3⁻. Statistical significance was determined by 1-way ANOVA * <0.05 , ** <0.01 (b-e and h-j) and by 2-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (f and g).



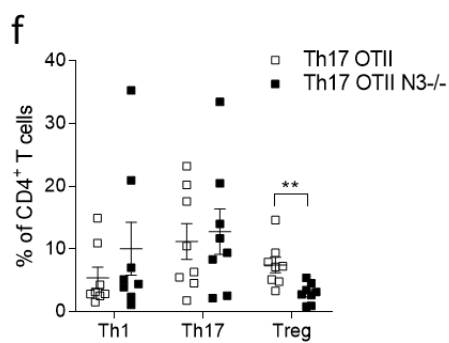
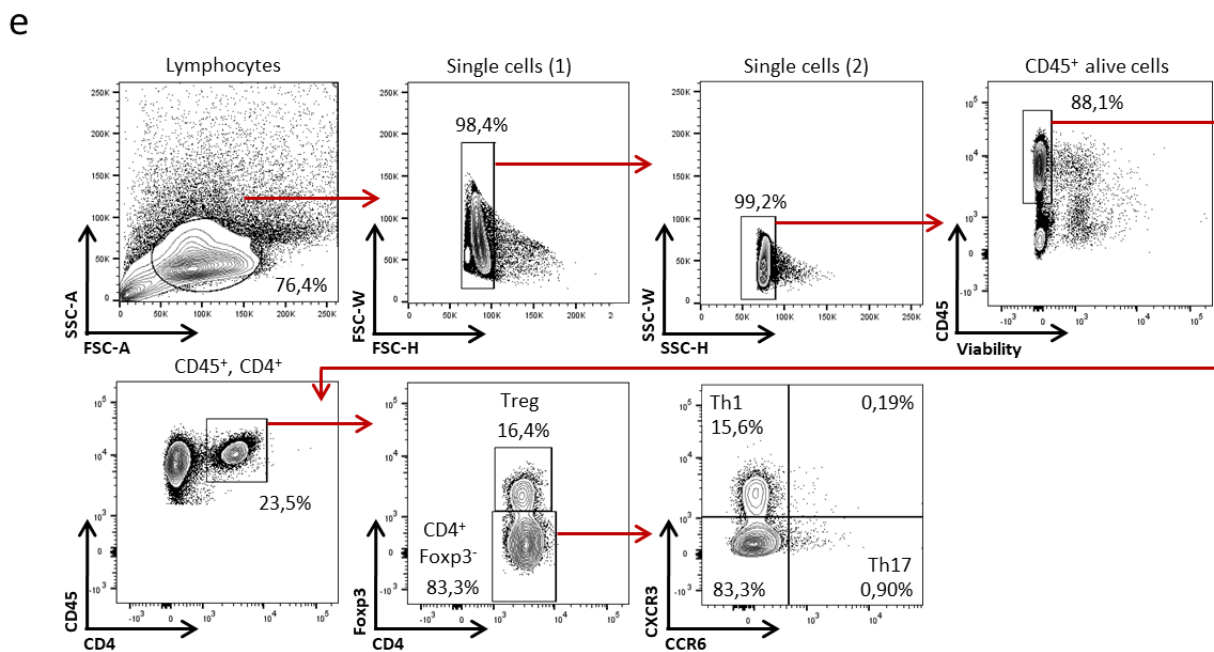
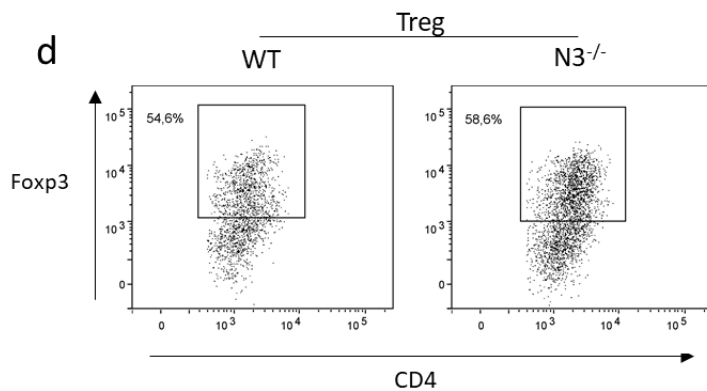
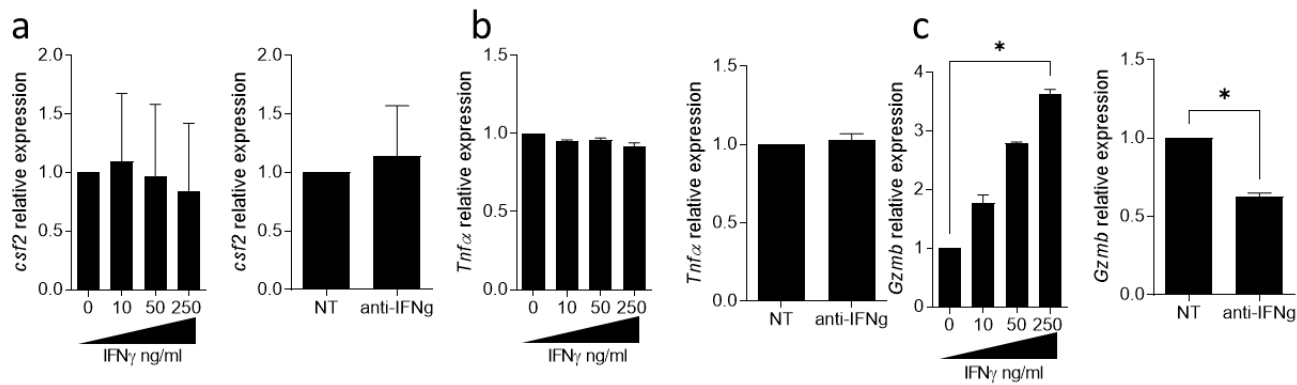
Extended Data Fig.4: Partial switch of regulatory Th17 cells.

a and b. LLC1 tumor growth in (a) CD4cre x N3fl mice and their controls treated or not with Digoxin (Digo) or (b) in wild type (WT), RORgt deficient (ROR), CD4wt x N3fl and CD4cre x N3fl mice. c-m. Th17 cells were differentiated for 3 days from naïve CD4 T cells isolated from CD4wt x N3^{fl} (WT) and CD4cre x N3^{fl} (N3^{-/-}) mice. c. TNFa detection by cytometry. d. Granzym B detection by cytometry. e. GM-CSF produced in the culture cell supernatant and quantified by ELISA. f. *Entpd1* mRNA relative expression. g. *Nt5e* mRNA relative expression. h. CD39 and CD73 expression detected by cytometry. i. Quantity of ATP detected in culture supernatant. j. Quantity of AMP detected in culture supernatant, k-m. Proton efflux rate (PER) (k), Oxygen consumption rate (OCR) (l) and Extracellular acidification rate (ECAR) (m) measured in during time with addition of Rotenone and Antimycin A (Rot/AA) at 25 min and addition of 2-deoxy-D-glucose (2-DG) at 45 min using an Agilent Seahorse. Cells were preliminarily differentiated 72h *in vitro*. Statistical significance was determined by 2-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (a and b) and 1-way ANOVA **<0.01 (e-g and i,j).



Extended Data Fig.5: Impact of *Nlrp3* deficiency on Th17 biology

a. Viability of B16-OVA cells assessed in flow cytometry after 24h *in vitro* co-culture with WT or *Nlrp3*^{-/-} OT-II Th17 cells. **b, c** B16F10 tumor growth (n=5) in CD4^{*Nlrp3*^{-/-}} mice and their controls, depleted in NK cells (c) or macrophages (d). **d-g.** mRNA expression of *Tbx21* (d), *Irf1* (e), *Eomes* (f) and *Ifng* (g), in WT or *Nlrp3*^{-/-} naïve CD4 T cells over time after addition of Th17 differentiation media. **h-i.** Phosphorylation level of STAT1 evaluated by flow cytometry in WT or *Nlrp3*^{-/-} naïve CD4 T cells over time after addition of Th17 differentiation media. **j.** Total SMAD3 expression detected by Immunofluorescent in Th17 cells *in vitro* differentiated from WT or *Nlrp3* deficient mice.



Extended Data Fig.6: Impact of NLRP3 on Th17 plasticity

a-c. mRNA expression of *Csf2* (a), *Tnfa* (b), and *Granzyme B* (c), in WT Th17 cells cultured 72h *in vitro* with increased IFN γ concentrations (left panels) or in *Nlrp3*^{-/-} Th17 cells cultured 72h with or without anti IFN γ antibody (right panels). Statistical significance was determined by 1-way Anova test (a-c) * <0.05, **<0.01, ***<0.005. **d.** Proportion of Foxp3⁺ cells determined by flow cytometry in WT or *Nlrp3*^{-/-} Tregs after 72h of *in vitro* differentiation. **e.** Gating strategy of intratumor helper T cells populations. CD4 T cells (CD45⁺ CD4⁺) and subpopulations, Treg (Foxp3⁺), Th1 (Foxp3⁻ CCR6⁻ CXCR3⁺), Th17 (Foxp3⁻ CCR6⁺ CXCR3⁻). **f.** Analysis of CD4 infiltrates in mouse lungs bearing B16OVA tumors 48h after CD45.2 OTII or CD45.2 OTII deficient for *Nlrp3* Th17 cells adoptive transfer. Statistical significance was determined by 2-way ANOVA *<0.05, **<0.01