



UNIVERSITE DE BOURGOGNE



INSERM U866



ÉCOLE DOCTORALE  
PRES | Bourgogne | Franche-Comté  
Environnements - Santé

## THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Sciences Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

Le jeudi 9 avril 2015

par

**Hélène BERGER**

### ***ÉTUDE DE LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES LYMPHOCYTES T CD4 DANS UN CONTEXTE DE CANCER : APPLICATION EN IMMUNOTHÉRAPIE ANTICANCÉREUSE.***

Directeur de thèse

**Pr. François GHIRINGHELLI**

#### **Membres du jury :**

Pr. Stéphane CHEVALIER  
Pr. Éric TARTOUR  
Dr. Laurent DELVA  
Dr. Nicolas FAZILLEAU  
Dr. Lionel APETOH  
Dr. Frédérique VÉGRAN  
Pr. François GHIRINGHELLI

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Co-encadrant de thèse  
Membre invité  
Directeur de thèse







UNIVERSITE DE BOURGOGNE



INSERM U866



ÉCOLE DOCTORALE  
PRES | Bourgogne | Franche-Comté  
Environnements - Santé

## THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Sciences Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

Le jeudi 9 avril 2015

par

**Hélène BERGER**

### ***ÉTUDE DE LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES LYMPHOCYTES T CD4 DANS UN CONTEXTE DE CANCER : APPLICATION EN IMMUNOTHÉRAPIE ANTICANCÉREUSE.***

Directeur de thèse

**Pr. François GHIRINGHELLI**

#### **Membres du jury :**

Pr. Stéphane CHEVALIER  
Pr. Éric TARTOUR  
Dr. Laurent DELVA  
Dr. Nicolas FAZILLEAU  
Dr. Lionel APETOH  
Dr. Frédérique VÉGRAN  
Pr. François GHIRINGHELLI

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Co-encadrant de thèse  
Membre invité  
Directeur de thèse



*« Ainsi les plus généreux ont coutume d'être les plus humbles. »*

*René Descartes*

*« Il n'existe rien de constant, si ce n'est le changement. »*

*Bouddha*

*Je dédie cette thèse à ma mère.*



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement les professeurs Éric Tartour et Stéphane Chevalier pour le temps consacré à examiner et évaluer ce manuscrit en qualité de rapporteur. Leur implication dans ce travail m'a permis d'améliorer substantiellement la qualité du manuscrit. Je remercie également les docteurs Laurent Delva et Nicolas Fazilleau, membres examinateurs de ce jury. J'espère que ce travail sera conforme à vos attentes.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de thèse, le professeur François Ghiringhelli, qui m'a accueillie au sein de son équipe. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur des projets tous plus passionnants les uns que les autres, merci pour la confiance accordée à l'égard de ces travaux, d'avoir été une source perpétuelle d'idées (de génie) et un véritable guide scientifique pendant ces quatre années. « Amazing director ».

Au docteur Lionel Apetoh, j'adresse toute ma gratitude également. Tout particulièrement pour avoir « volé à mon secours » dès les débuts de cette aventure même si Frédérique et toi étiez déjà bien occupés. Sans tes encouragements, je ne pense pas que j'aurai eu un jour la chance de promouvoir nos recherches à l'international. Merci pour ce formidable tremplin/boost/coup de pied aux fesses qui m'a permis de présenter à Boston. Merci pour ton encadrement de qualité au regard de ton implication dans la relecture-raturage-correction des écrits que j'ai fourni, que ce soit pour une demande de financement, un abstract ou encore ce manuscrit. Enfin, merci pour les discussions enrichissantes, pour ton soutien et tes précieux conseils, tout spécialement en cette fin d'aventure. Mais aussi, merci Lionel pour toutes les souris!

Mes remerciements les plus sincères au docteur Frédérique Végran sans qui je n'aurai pas mené cette thèse dans de si bonnes conditions. Fréd, bien plus qu'une encadrante, tu as été pour moi un véritable mentor. Tu m'as inculqué bien davantage que la rigueur et l'organisation indispensables à l'entreprise des recherches. A tes côtés, j'ai notamment pu saisir la démarche logique à acquérir au cours de la réalisation d'un projet tout en abattant un « boulot monstre ». Tu m'as tellement appris. Merci d'avoir été aussi présente au

quotidien, de m'avoir fait bénéficier de tes connaissances techniques et scientifiques ; tes compétences d'encadrement ont indéniablement fait de moi une étudiante plus autonome qu'à ses débuts de petit poussin perdu (enfin je l'espère !). Et oui, tu es un exemple de femme chercheur qui tabasse !

A toute la team FG à présent : que dire ? Un immense merci pour votre bonne humeur, votre amitié, votre soutien au quotidien et ce lien incroyable entre nous, j'ai nommé « le serrage de coudes ». A ceux qui m'ont accueillie à mes débuts : Fanny, Mélanie, Valentin, Angélique, Cédric et Grégoire, merci d'avoir été aussi bienveillants et toujours de bons conseils. J'adresse mes remerciements à Romain Boidot pour ses conseils avisés et sa gentillesse dans le travail à ses côtés. Merci aux jeunes arrivés en chemin, Emeric, Romain (Minou), Hélène, Marie, Marionnette, Flavie, Etienne, Alexia et Pierre. A vous tous, mention très spéciale pour avoir rendu certains moments inoubliables !!!! A tous les stagiaires présents, Nina, Romain, Lucie, Lucile et Antoine, bonne chance pour la suite des événements, je vous souhaite à tous de réussir. Aux filles du 2<sup>ème</sup> étage, Magalie, Thaïz et Aurélie, bonne continuation ! A Christel, un très grand merci pour ton aide précieuse, ton soutien et tes encouragements au quotidien ! A tous encore, je ne saurais exprimer à quel point travailler ensemble et à vos côtés au laboratoire a été pour moi agréable et même source de bien-être !!!! May the force be with you and the publi too !

Je remercie tous les membres de l'U866 que j'ai pu côtoyer durant ma thèse pour nos échanges au quotidien. Je souhaite tout particulièrement remercier Catherine pour sa présence discrète tout au long de mon parcours, son optimisme et sa gentillesse en plus de toutes ses qualités scientifiques ! Je crois que tu as été la première hors team FG à me témoigner ta bienveillance. A Laurence ensuite, pour nos derniers échanges, vos encouragements m'apportent un peu plus confiance pour la suite. Enfin, un très grand merci à Arlette, pour tes conseils en cytométrie, pour nos tris souris et humains et pour ta formidable énergie qui nous offre de très bons souvenirs quant aux moments de réunion des équipes. A Jean et Romain, des compagnons de route au cœur d'or avec qui j'ai pu partager les up and down inhérents à la thèse, merci pour tout ! La thèse a été plus douce à vos côtés.

Mes remerciements vont enfin à mes tous proches et à ma famille qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail. A mes amies pour leur présence, leur patience et

leur compréhension au long de ces quatre années. Un grand merci aux girls chéries de la BGD, Laure-Anne et Audrey, qui ont su me redonner de l'énergie au travers de nos moments dijonnais et bruxellois et leurs petits mots d'encouragement aussi ! Merci à Axelle d'être ma tartine de confiture et pour nos vingt ans d'amitié partagée. A mes parents, pour leur amour inconditionnel et pour leur soutien indéfectible lors des moments plus difficiles, vous avez fait de moi ce que je suis et m'avez accompagnée quoique j'entreprenne. J'ai conscience de la chance que j'ai d'avoir des parents qui ont toujours cru en moi, me donnant la possibilité de réaliser mes souhaits. A mes frère et sœurs qui ont su trouver les mots pour reconforter souvent, pensée spéciale à mon Axou d'amour qui m'a tellement aidée. A Béa et Alex, merci de m'avoir donné une telle place dans vos vies et celle de Lise. A Lise justement, mon petit trésor, ma nièce, the one ! Sache que chaque instant passé à tes côtés, chaque rire partagé me remplit de joie et me donne une énergie débordante pour la suite. J'ai une chance inouïe de t'avoir dans ma vie et je suis une tata Nanou complètement fan de toi.

Ces travaux n'auraient pas pu voir le jour sans le soutien financier de l'INSERM, de la région Bourgogne et de la Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer.

## RÉSUMÉ

La surveillance immunologique des tumeurs repose sur la capacité des cellules effectrices du système immunitaire à détecter et à éliminer les cellules cancéreuses. Nonobstant ce constat, la régression complète et spontanée de cancers établis n'est observée que dans de très rares cas. L'échec de la résolution des cancers par le système immunitaire pourrait résulter de la conjonction de plusieurs facteurs : i) une réponse immune inadéquate liée au manque d'immunogénicité des tumeurs, ii) l'incompétence du système immunitaire consécutif à des immunodéficiences acquises ou induites et iii) la sélection de variants tumoraux résistants capables de déjouer la surveillance opérée par le système immunitaire ou de subvertir ses effets. Ainsi, le développement de stratégies visant à potentialiser les réponses antitumorales de l'hôte revêt un enjeu crucial en cancérologie.

Au laboratoire, notre travail de recherche a pour objectif de mieux caractériser les liens entre réponse immunitaire et cancer. Mon travail de thèse vise précisément à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des lymphocytes T CD4 et à déterminer le rôle de ces cellules dans l'immunité antitumorale. Au cours de ma thèse, nous nous sommes particulièrement attachés à explorer les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la différenciation des populations lymphocytaires Th17, Th9 et TFh pour mieux appréhender et moduler leurs fonctions effectrices afin d'optimiser les réponses antitumorales. Ces travaux s'inscrivent dans une démarche d'application potentielle en immunothérapie anticancéreuse, un domaine de recherches qui connaît actuellement des avancées spectaculaires.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de l'acide docosahexaénoïque (DHA), un acide gras à longue chaîne de la série n-3, sur la différenciation des cellules Th17. Nous avons mis en évidence le mécanisme moléculaire responsable de l'inhibition directe de la polarisation cellulaire Th17 par le DHA. L'activation de PPAR $\gamma$  par le DHA induit l'expression de SOCS3 qui agit comme un répresseur intrinsèque de la différenciation Th17. Dans deux modèles de cancers murins, nous avons également montré que l'activité anticancéreuse du DHA était dépendante de sa capacité à inhiber la sécrétion d'IL-17 par les cellules T CD4 *in vivo*. Nous avons ainsi caractérisé l'un des mécanismes impliqués dans l'effet anticancéreux du DHA.

Dans un deuxième travail, nous avons caractérisé les effets de l'interleukine 1 $\beta$  sur le programme moléculaire des cellules Th9. Nous avons montré que les cellules Th9 différenciées en présence d'IL-1 $\beta$  possédaient de puissantes propriétés anticancéreuses dépendantes de l'IL-21 reposant sur l'activation du facteur de transcription IRF1. Au niveau moléculaire, nous avons démontré que l'IL-1 $\beta$  induisait la phosphorylation de STAT1 elle-même responsable de l'activation d'IRF1 qui est alors capable d'interagir sur les promoteurs de l'*IL9* et de l'*IL21* pour induire l'expression de ces gènes dans les cellules Th9.

Le dernier projet porte sur la régulation transcriptionnelle du facteur de transcription IRF1 sur la réponse T folliculaire auxiliaire et cherche à en évaluer les retombées potentielles en immunothérapie anticancéreuse. Notre étude met en évidence l'activation précoce d'IRF1 dans la différenciation TFh et suggère que ce facteur de transcription semble initier le développement de ces cellules. Des approches de transfert adoptif révèlent que les TFh semblent posséder des propriétés anticancéreuses capables de limiter efficacement la croissance des tumeurs dans des modèles murins. Enfin, après caractérisation phénotypique nous montrons que les cellules TFh sont présentes dans des tumeurs mammaires chez l'Homme et validons la présence d'IRF1 dans ces lymphocytes.

Mots clés : différenciation lymphocytaire T CD4, régulation transcriptionnelle, IRF1, DHA, immunothérapie anticancéreuse

## ABSTRACT

Immune surveillance of tumors is based on the ability of effector cells of the immune system to detect and eliminate the cancer cells. Notwithstanding, the complete and spontaneous regression of established cancers was observed only in very few cases. The failure of cancer resolution by the immune system could result from the combination of several factors: i) inadequate immune response related to a low tumor immunogenicity, ii) incompetent immune system consecutively to induced or acquired immunodeficiencies and iii) the selection of resistant tumor variants able to thwart immune surveillance or subverting immune responses. Developing novel cancer immunotherapy strategies leading to potentiation of the host antitumor responses is thus a key challenge in oncology.

We aim to better characterize the relationships between immune response and cancer. My work is precisely to understand the molecular mechanisms involved in CD4 T cell differentiation and to determine the role of these cells in antitumor immunity. I am particularly committed to explore the molecular mechanisms underlying the Th17, Th9 and TFh cell differentiations. The goal is to better understand and adjust their effector functions to optimize antitumor responses. This work is part of a potential application in cancer immunotherapy approach, an area that is experiencing dramatic advances and is likely to grow in the years ahead.

We first studied the influence of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) on Th17 cell differentiation. We unraveled the molecular mechanism responsible for the direct inhibition of Th17 cell polarization by DHA, explaining one way of DHA to exert its anticancer activity. TH17 cells induced *in vitro* displayed increased SOCS3 expression and diminished capacity to produce interleukin 17 following activation of PPAR $\gamma$  by DHA. In two different mouse cancer models, DHA prevented tumor outgrowth and angiogenesis in an IL-17-dependent manner. Altogether, our results uncover a novel molecular pathway by which PPAR $\gamma$ -induced SOCS3 expression prevents IL-17-mediated cancer growth.

Then, we characterized the effects of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) on Th9 cells molecular program. We found that the transcription factor IRF1 enhanced the effector functions of Th9 cells and dictated their anticancer properties. Under Th9-skewing conditions, IL-1 $\beta$  induced

phosphorylation of the transcription factor STAT1 and subsequent expression of IRF1, which bound to *IL9* and *IL21* gene promoters and enhanced their secretion by Th9 cells. In addition, IL-1 $\beta$ -induced Th9 cells exerted potent anticancer functions in an IRF1- and IL-21-dependent manner. Thus, our findings identify IRF1 as a target for controlling the function of Th9 cells.

We are currently investigating the transcriptional regulation of IRF1 on follicular helper CD4 T (TFh) cell program. We address the question whether TFh cells could be beneficial in cancer immunotherapy. Our study highlights the early activation of IRF1 during the TFh cell polarization and suggests that IRF1 appears to initiate the development of these cells. Adoptive transfer approaches show that TFh lymphocytes seem to harbor anticancer properties by limiting efficiently tumor outgrowth in mouse models of cancer. Finally, phenotypic characterization of TFh cells points out that they infiltrate human breast tumors and express IRF1.

Key words: CD4 T cell differentiation, transcriptional regulation, IRF1, DHA, cancer immunotherapy

## SOMMAIRE

RÉSUMÉ .....	8
ABSTRACT .....	10
LISTE DES TABLEAUX .....	14
LISTE DES FIGURES .....	15
INTRODUCTION .....	18
Préambule .....	19
I. L'immunité antitumorale : les effets paradoxaux de l'immunité de l'hôte sur la progression tumorale.....	21
1. Naissance du concept de l'immunosurveillance des tumeurs .....	21
2. Révision du concept : la notion d'immunoediting du cancer.....	27
II. Les lymphocytes T CD4 et l'immunité antitumorale.....	44
1. Généralités sur la mise en place de la réponse immune innée et adaptative .....	44
2. La différenciation des cellules T CD4 naïves .....	50
3. Les cellules Th1.....	54
4. Les cellules Th2.....	56
5. Les cellules Th17.....	58
6. Les cellules Treg induites.....	62
7. Les cellules Th9.....	66
8. Les cellules TFh .....	68
9. Les cellules Th22.....	73
10. La plasticité des cellules T CD4 soutient leur transdifférenciation .....	76
III. Le microenvironnement tumoral comme cible d'immunomodulation.....	82
1. Les dix caractéristiques fondamentales de la cellule tumorale .....	82
2. Les microenvironnements normal et tumoral .....	83
3. Environnement tumoral et évolution de la pathologie cancéreuse .....	86
4. Le potentiel antitumoral des acides gras polyinsaturés de la série n-3.....	87
5. Stratégie d'immunothérapie cellulaire anticancéreuse.....	93
IV. Objectifs du travail de thèse .....	98



RÉSULTATS.....	100
I. Article 1 .....	101
Conclusion .....	123
II. Article 2 .....	124
Conclusion .....	151
III. Article 3 en préparation .....	152
1. L'expression d'IRF1 est requise pour induire la différenciation des TFh <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	154
2. L'expression d'IRF1 est dépendante de l'activation de STAT1.....	156
3. IRF1 dirige le programme transcriptionnel des TFh <i>via</i> la transactivation de <i>Bcl6</i> , <i>d'Ascl2</i> , <i>d'Il21</i> et <i>d'Il6</i> .....	160
4. La boucle autocrine d'IL-6 maintient le phénotype TFh .....	162
5. Les cellules TFh exercent des propriétés antitumorales.....	164
6. Caractérisation des TFh chez l'Homme .....	166
7. Conclusion .....	170
DISCUSSION.....	172
I. Impact du DHA sur le développement des cellules Th17 dans un contexte tumoral ou comment restaurer une réponse anticancéreuse efficace au moyen d'une molécule anti-inflammatoire .....	173
II. Potentialisation des fonctions antitumorales des cellules Th9 par l'IL-1 $\beta$ ou comment renforcer les défenses anticancéreuses.....	175
III. Activité transcriptionnelle d'IRF1 sur le profil TFh : de l'approche moléculaire aux enjeux de thérapie cellulaire .....	177
IV. Les facteurs de transcription des familles des STAT et des IRF et l'IL-21 au cœur des mécanismes de régulation impliqués dans le contrôle de la différenciation des sous-types cellulaires Th17, Th9-IL-1 $\beta$ et TFh .....	178
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	182
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	184
ANNEXES.....	210

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Influence de déficits immunitaires sur l'incidence de cancers chez l'Homme .....	24
<b>Tableau 2.</b> Susceptibilité de souris immunodéficientes au développement de tumeurs spontanées ou chimiquement induites .....	30
<b>Tableau 3.</b> Représentation schématique et classification des PRR et de leurs ligands .....	48
<b>Tableau 4.</b> Corrélation entre nature des cellules immunes infiltrant la tumeur et pronostic clinique .....	65
<b>Tableau 5.</b> Caractérisation phénotypique des cellules TFh chez l'Homme et la souris .....	70

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Le concept d'immunoediting des cancers .....	26
<b>Figure 2.</b> Schéma expérimental illustrant l'influence du statut immunitaire de souris sur leur susceptibilité à l'induction tumorale par un agent carcinogène .....	28
<b>Figure 3.</b> Preuve expérimentale de l'existence de la phase d'équilibre au cours de l'immunoediting du cancer .....	32
<b>Figure 4.</b> Mécanismes d'échappement tumoral à l'attaque immunologique .....	35
<b>Figure 5.</b> Représentation schématique de l'hématopoïèse aboutissant à la génération des principales composantes cellulaires de l'immunité innée et adaptative.....	43
<b>Figure 6.</b> La synapse immunologique et les signaux moléculaires engageant l'activation des cellules T CD4 .....	49
<b>Figure 7.</b> La différenciation des lymphocytes T CD4.....	52
<b>Figure 8.</b> Modèle intégratif de la différenciation cellulaire TFh .....	69
<b>Figure 9.</b> Schéma récapitulatif du contrôle de la différenciation cellulaire T CD4 via l'interaction entre facteurs de transcription.....	75
<b>Figure 10.</b> Les modes d'interaction entre facteurs de transcription .....	77
<b>Figure 11.</b> La flexibilité et la plasticité cellulaire T CD4.....	79
<b>Figure 12.</b> Les 10 caractéristiques fondamentales des cellules tumorales .....	81
<b>Figure 13.</b> La contexture immunitaire .....	85
<b>Figure 14.</b> Biosynthèse et métabolisme de base des acides gras polyinsaturés des séries n-6 et n-3.....	88
<b>Figure 15.</b> Le ciblage de l'inflammation chronique comme stratégie thérapeutique antitumorale .....	96
<b>Figure 16.</b> Influence du DHA sur la différenciation lymphocytaire Th17.....	123
<b>Figure 17.</b> Rôle d'IRF1 dans le programme transcriptionnel des cellules Th9.....	151
<b>Figure 18.</b> Activité transcriptionnelle d'IRF1 sur le programme des cellules TFh .....	171
<b>Figure 19.</b> Représentation schématique de l'implication des STAT et IRF dans le contrôle de la différenciation lymphocytaire T CD4 .....	179

## LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Arachidonique	DC : Cellule Dendritique
ADN : Acide Désoxy-riboNucléique	DHA : Acide DocosaHexaénoïque
ADP : Adénosine Di-Phosphate	DNMT1 : DNA (cytosine-5)-Methyl Transferase
AGPI : Acides Gras PolyInsaturés	EPA : Acide EicosaPentaénoïque
Ahr : Aryl hydrocarbon receptor	FLIP : FLICE-Like Inhibitory Protein
ARN : Acide RiboNucléique	Foxo1 : Forkhead box O1
Ascl2 : Achaete-Scute Complex Homolog 2	Foxp3 : Forkhead box P3
ATP : Adenosine Tri-Phosphate	GAS : IFN-Gamma Activating Sequence
BATF : Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	GATA3 : GATA-binding protein 3
BCG : Bacille de Calmette-Guérin	Gfi-1 : Growth factor independent-1
Bcl : B-cell lymphoma	GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR-related protein
Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large	GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony -Stimulating Factor
BCR : B-Cell Receptor	HMGB : High Mobility Group Box
BIR : Baculovirus Inhibitor Repeat	HSP : Heat Shock Protein
Blimp-1 : B lymphocyte-induced maturation protein-1	IAP : Inhibitor of Apoptosis
C3G : Cyanidine 3-Glucoside	ICOS : Inducible T-cell CO-Stimulator
CAR : Chimeric Antigen Receptor	IDO : Indéolamine 2,3-DiOxygénase
CAF : Cancer-Associated Fibroblasts	IFN : InterFéron
CCR7 : Chemokine (C-C motif) Receptor 7	IG : ImmunoGlobuline
CD : Cluster de Différenciation	IL : InterLeukine
CLR : C-type Lectin Receptors	ILC : Innate Lymphoid Cell
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	IRF : Interferon Regulatory Factor
COX : CycloOxygénase	ISRE : IFN-Stimulated Response Element
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène	ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte	JAK : JAnus Kinase
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4	Kfl2 : Krüppel-like factor 2
DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern	KIR : Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor

LGP2 : Laboratory of Genetics and Physiology 2

LMP : Low Molecular mass Polypeptide

LPS : LipoPolySaccharide

LRR : Leucine Rich Repeat

LXR : Liver X Receptor

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCA : 3'-MéthylCholAnthrène

MCP1 : Monocyte Chemotactic Protein 1

MDA5 : Melanoma Differentiation

-Associated gene 5

MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cell

MEC : Matrice ExtraCellulaire

NACHT : NAIP, CIITA, HET-E et TP-1

NAIP : Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein

NFATc2 : Nuclear Factor of Activated T cell 2

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

NK : Natural Killer

NKT : Natural Killer T

NLR : NOD-Like Receptor

OLS : Organe Lymphoïde Secondaire

ORL : Oto-Rhino-Laryngologique

PAF : Platelet Activating Factor

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PD-1 : Programmed cell Death protein 1

PD-L1 : Programmed cell Death 1 Ligand 1

PGE2 : ProstaGlandine E2

PI3K :Phosphoinositide 3-Kinase

PLA2 : PhosphoLipase A2

PRR : Pattern-Recognition Receptor

PYD : PYrin Domain

Rag : Recombination Activating Gene

RLR : RIG-I (Retinoic acid-Inducible gene-I)-Like Receptor

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

scFv : single-chain variable Fragment

SOCS : Suppressor Of Cytokine Signaling

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

TAM : Tumor-Associated Macrophage

T-bet : T-box transcription factor

TCR : T-Cell Receptor

TFh : T Folliculaire helper

TGF- $\beta$  : Tumor Growth Factor  $\beta$

Th : T helper

TIR : Toll/IL-1 Receptor

TLR : Toll-Like Receptor

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha

TPA :

12-O-TétradécanyPhorbol-13-Acétate

TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Treg : T régulateurs

Trp1 : Tyrosine-Related Protein 1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

## **INTRODUCTION**

## Préambule -

D'après les données épidémiologiques publiées par l'Institut National du Cancer, l'incidence des cancers est estimée à 355 000 nouveaux cas diagnostiqués en France en 2012 (INCa, 2014). Chez l'homme, les cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate, du poumon et du côlon-rectum pour les tumeurs solides. De même, chez la femme, le cancer du sein se place devant le cancer colorectal et le cancer du poumon. Bien que la mortalité par cancer ait diminué au cours des vingt dernières années, les derniers chiffres font état de près de 148 000 décès par cancer en France en 2012. Malgré les progrès récents réalisés dans le diagnostic précoce et la prise en charge des cancers, la pathologie cancéreuse demeure la première cause de mortalité prématurée en France chez l'homme et la seconde chez la femme.

Si le terme générique de "cancer" regroupe un ensemble hétérogène de pathologies tumorales malignes, toutes résultent, d'un point de vue biologique, d'une prolifération incontrôlée de cellules qui échappent aux mécanismes de défense de l'organisme. La multiplication anarchique de ces cellules anormales donne naissance à des tumeurs se développant localement (foyer primitif) et/ou à distance du site initial ; la maladie se propage alors *via* la dissémination de métastases colonisant les organes voisins. La maladie peut être d'évolution lente, "à bas bruit", ou plus agressive selon le type de cancer considéré.

Pour traiter les pathologies cancéreuses, les cliniciens disposent actuellement d'un panel de modalités thérapeutiques pouvant être administrées seules ou en association. La combinaison de ces techniques s'inscrit dans une démarche thérapeutique globale visant d'une part à améliorer l'efficacité du traitement anticancéreux et, d'autre part, à prendre en compte le profil biologique de la tumeur afin d'orienter un traitement de plus en plus personnalisé. Dans le cas du cancer du sein notamment, la résection chirurgicale de la tumeur peut être précédée ou complétée d'une irradiation locale et/ou de chimiothérapie (molécule cytostatique bloquant la croissance des cellules en phase de multiplication rapide) et parfois d'hormonothérapie. Toutefois, ces schémas thérapeutiques ne constituent pas toujours un arsenal efficace pour l'éradication clinique de la tumeur. L'échec thérapeutique se traduit alors par la persistance de cellules tumorales résiduelles capables de contourner

les stratégies curatives mises en place. Le constat de populations cellulaires néoplasiques hétérogènes régnant au sein de la tumeur a fait émerger deux hypothèses qui s'opposent à l'heure actuelle pour tenter d'expliquer le phénomène de progression tumorale. La première énonce qu'une faible proportion de cellules souches cancéreuses présentent la capacité de s'auto-renouveler et de proliférer, ces cellules progénitrices seraient alors responsables du potentiel de croissance et de progression de la tumeur ainsi que de son hétérogénéité cellulaire (Jordan *et al.*, 2006). Le modèle stochastique postule quant à lui que toute cellule tumorale est capable de se renouveler mais que la probabilité qu'une cellule néoplasique entre en cycle cellulaire et trouve un environnement permissif pour croître est en revanche variable (Johnsen *et al.*, 2009).

De tels échappements aux thérapies anticancéreuses classiques nécessitent donc une approche plus ciblée dans le but d'optimiser la réponse antitumorale et de garantir *in fine* une rémission totale (Zitvogel *et al.*, 2008). Les thérapies conventionnelles peuvent en effet être secondées par des thérapeutiques ciblées mieux tolérées par les patients atteints de cancer (molécules non directement cytotoxiques ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses sans endommager les cellules saines). Dans cette optique, l'approche immunologique constitue un enjeu d'importance dont la promesse est de mobiliser, si ce n'est de potentialiser, les défenses immunitaires de l'hôte dans la lutte contre la maladie. Le recours à l'immunothérapie antitumorale représente donc un véritable espoir et un champ d'investigations très actives à ce jour dans la recherche en cancérologie. Témoignage de l'engouement qu'elle suscite au sein de la communauté scientifique, la prestigieuse revue Science a récemment placé l'immunothérapie des cancers au premier rang des avancées scientifiques de l'année 2013 (Couzin-Frankel, 2013).

La démarche tenant à préciser toujours davantage les liens entre réponses immunitaires et cancer associée à une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression tumorale alimentent le développement d'approches anticancéreuses innovantes, mieux adaptées, dont l'objectif est de restaurer et/ou de potentialiser la réponse immunitaire du malade pour renforcer les effets thérapeutiques.



# I. L'immunité antitumorale : les effets paradoxaux de l'immunité de l'hôte sur la progression tumorale

## 1. Naissance du concept de l'immunosurveillance des tumeurs

### 1.1. La genèse du concept : l'immunologie des tumeurs comme pierre angulaire

La contribution du système immunitaire à la résolution et/ou au contrôle des tumeurs a été suggérée dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par William B. Coley dont les observations mettaient en évidence une corrélation entre régression tumorale et infection. La survenue postopératoire d'infections à streptocoque chez des patients atteints de sarcomes osseux s'était avérée déterminante pour l'obtention de réponses complètes sans récurrence (Coley, 1893). Ces données cliniques ont permis d'établir l'hypothèse selon laquelle une réaction inflammatoire secondaire à une infection contribuerait au contrôle de la progression tumorale. Elles fondent également les toutes premières approches d'immunothérapie antitumorale par l'injection de toxines bactériennes (toxines de Coley) visant à stimuler le système immunitaire pour induire une régression tumorale (Coley, 1891). Ce principe reste toujours d'actualité avec l'injection du bacille de Calmette-Guérin (BCG) dans le cadre du traitement de cancer de la vessie où il a prouvé son efficacité après chirurgie depuis plus de 35 ans (Alexandroff *et al.*, 2010). De récents travaux démontrent en outre que les forts taux de réponse clinique associés à l'inoculation intravésicale de BCG sont corrélés à une forte infiltration de cellules T productrices d'Interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dans les ganglions lymphatiques drainant la vessie (Biot *et al.*, 2012).

Le concept d'immunosurveillance des cancers a été initialement émis par Paul Ehrlich au début du siècle dernier. Postulant que les transformations tumorales survenaient naturellement avec une fréquence élevée, il suggéra que l'occurrence modérée des tumeurs chez l'Homme résultait de la capacité du système immunitaire à endiguer le développement tumoral (Ehrlich, 1909). Mais ce n'est qu'à la fin des années 1950 que les bases fondamentales de cette théorie ont été formellement établies par Frank Macfarlane Burnet et Lewis Thomas (Burnet, 1957; Thomas, 1959). L'immunosurveillance tumorale conceptualise l'idée selon laquelle le système immunitaire serait en alerte perpétuelle contre les cellules néoplasiques émergentes pour les éliminer, prévenant ainsi le développement des tumeurs (Burnet, 1970). Leur hypothèse attribuait notamment un rôle

essentiel de sentinelles aux lymphocytes T dans la reconnaissance et l'élimination permanentes des cellules tumorales naissantes.

### 1.2. Les preuves du concept : arguments modélisés chez l'animal puis étendus à l'Homme

De nombreuses constatations expérimentales murines soutiennent cette théorie de l'immunosurveillance et sont regroupées de façon non exhaustive dans le Tableau 2 évoqué plus loin (*Tableau 2*, p. 30). Historiquement, cette théorie a d'abord été appuyée par les travaux de *Medawar & coll.* qui ont permis de clarifier le rôle essentiel des composants de l'immunité dans le rejet de l'allogreffe (Medawar, 1944). Leurs observations concernant l'éradication de tumeurs transplantées chez des souris non consanguines fit émaner l'idée d'une vaccination, laquelle a cependant été davantage assimilée à un rejet de greffe (rejet du non-soi inhérent à l'allogreffe) qu'à l'implication d'un rejet tumoral spécifique. La notion d'un contrôle immunologique des tumeurs a ensuite été principalement soutenue par des travaux mettant en évidence le rejet de tumeurs transplantables, induites par des virus ou des agents carcinogènes chimiques, par le système immunitaire d'hôtes syngéniques (Burnet, 1964; Klein, 1966; Old and Boyse, 1964; Thomas, 1959). Le recours à des modèles expérimentaux utilisant des souris syngéniques tendait à démontrer que les cellules cancéreuses étaient immunologiquement distinctes des cellules normales (Klein, 1966) et suggérait l'implication de lymphocytes T spécifiques d'antigènes associés à la tumeur (TAA) dans le contrôle de la progression tumorale (Prehn and Main, 1957). D'autres expériences ont rapporté que l'immunisation préalable de souris de souche syngénique par des cellules tumorales irradiées prévenait ultérieurement la croissance de tumeurs transplantées. De même, il a été constaté que le transfert de lymphocytes isolés des souris ayant préalablement rejeté la tumeur conférait à l'hôte une résistance au développement de la greffe de tumeurs (Burnet, 1970). Plus tard, avec la démonstration fonctionnelle de l'existence d'antigènes tumoraux spécifiques chez la souris (Old and Boyse, 1964), cette notion d'immunosurveillance gagna en reconnaissance auprès de la communauté scientifique (Burnet, 1970).

Chez l'Homme, de nombreux arguments viennent également étayer cette théorie de l'immunosurveillance des tumeurs (*Tableau 1*, p. 24). En effet, le suivi épidémiologique à long terme de patients a permis d'observer une incidence plus élevée des cancers en

situation d'immunodéficience primaire (ataxie télangiectasie, syndrome de Wiskott Aldrich, trisomie 21) (Doll and Kinlen, 1970; Penn, 1999) ou secondaire (syndrome de l'immunodéficience acquise, traitements immunosuppresseurs) (Boshoff and Weiss, 2002; Clifford *et al.*, 2005). Notons qu'il a par la suite été démontré que ces tumeurs présentaient pour la plupart une origine virale reflétant la susceptibilité accrue de ces patients aux infections : virus d'Epstein-Barr et survenue de lymphomes non Hodgkiniens, virus de l'herpès associé au développement du sarcome de Kaposi, papillomavirus initiant les cancers uro-génitaux (Pardoll, 2003). Néanmoins, un risque plus élevé de développer des cancers ne présentant pas d'étiologie virale comme des cancers du poumon, du rein, du côlon, du pancréas et des mélanomes a été observé chez de nombreux patients immunodéprimés suite à une transplantation d'organe (Dunn *et al.*, 2004; Hollenbeak *et al.*, 2005).

De plus, l'hypothèse que l'action des drogues immunosuppressives est directement responsable de l'augmentation de l'incidence des cancers est consolidée par le fait que des patients recevant de telles thérapies pour d'autres pathologies, telles les maladies auto-immunes (arthrites rhumatoïdes ou lupus érythémateux systémique), présentent également un risque accru de développer un cancer comparativement aux sujets sains. Ainsi, nature, intensité et durée du traitement immunosuppresseur constitueraient des facteurs de risque concernant la survenue de cancers chez les patients greffés (Chapman *et al.*, 2013).

D'autres situations d'immunodéficience sont également associées à une prédisposition pour le développement de cancers, comme c'est le cas pour les patients souffrant du syndrome de Chediak-Higashi (caractérisé par un dysfonctionnement dans la cytotoxicité des cellules Natural Killer : NK) qui présentent un risque de cancer 200 fois plus élevé que les sujets sains (Kobayashi, 1985). Certains polymorphismes des récepteurs NKG2D (*Natural Killer Group 2, member D*) ou KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*) - récepteurs activateurs ou inhibiteurs des NK - affectent la cytotoxicité des NK ; ces polymorphismes sont associés à un sur-risque de développer des cancers (Carrington *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2006). Il en est de même pour certains polymorphismes inactivateurs de FasL (*Fas Ligand*), ou pour les patients porteurs de mutations du gène de la perforine (Clementi *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005).

**Tableau 1. Influence de déficits immunitaires sur l'incidence de cancers chez l'Homme.**

<i>Cas clinique</i>	<i>Caractéristiques immunitaires</i>	<i>Observations</i>
<b>Trisomie 21</b>	Déficit fonctionnel des LT	↗ incidence de leucémie aigüe myéloblastique (x20)
<b>Syndrome de Wiskott-Aldrich</b>	Déficit fonctionnel des LT et LB	↗ incidence de syndrome lymphoprolifératif secondaire à une infection par EBV
<b>Ataxie télangiectasie</b>	Déficit fonctionnel des LT	↗ incidence de lymphomes, leucémies et maladies de Hodgkin
<b>VIH</b>	Déficit immunitaire lié à l'apoptose des LT CD4	↗ incidence de cancers viro-induits ↗ incidence de cancers du poumon Même risque de développer certains cancers non viro-induits prédominant dans la population générale (ex : sein, prostate)
<b>Transplantation</b>	Immunodéficience secondaire liée aux traitements immunosuppresseurs	↗ incidence de cancers viro-induits ↗ incidence de cancers non viro-induits ↗ incidence de cancers cutanés (x200)
<b>Mutation biallélique du gène de la perforine</b>	Immunodéficience primaire (cellules NK et LT CD8 peu fonctionnels)	↗ risque de développer des lymphomes non nécessairement viro-induits
<b>Polymorphisme de NKG2D ou KIR</b>	Faible activité cytotoxique des cellules NK	risque de développer des cancers non viro-induits (poumons, intestins)
<b>Syndrome de Chediak-Higashi</b>	Cytotoxicité anormale des NK	risque de cancer x200

Enfin, le rôle de l'infiltrat immunitaire a été investigué dans de nombreux cancers (Clemente *et al.*, 1996; Galon *et al.*, 2006; Pages *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). La présence de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) est un facteur de bon pronostic améliorant la survie globale des patients. Une infiltration tumorale avec des taux élevés d'effecteurs immunitaires (lymphocytes CD8<sup>+</sup>, lymphocytes CD4<sup>+</sup> de type Th1, cellules NK), associée à de faibles taux de cellules immunosuppressives est corrélée à un meilleur pronostic dans la majorité des types histologiques néoplasiques (Fridman *et al.*, 2012). Les aspects quantitatif et qualitatif des cellules immunitaires infiltrantes et leurs effets sur le développement tumoral seront plus amplement commentés dans la section traitant de l'immunité antitumorale adaptative.

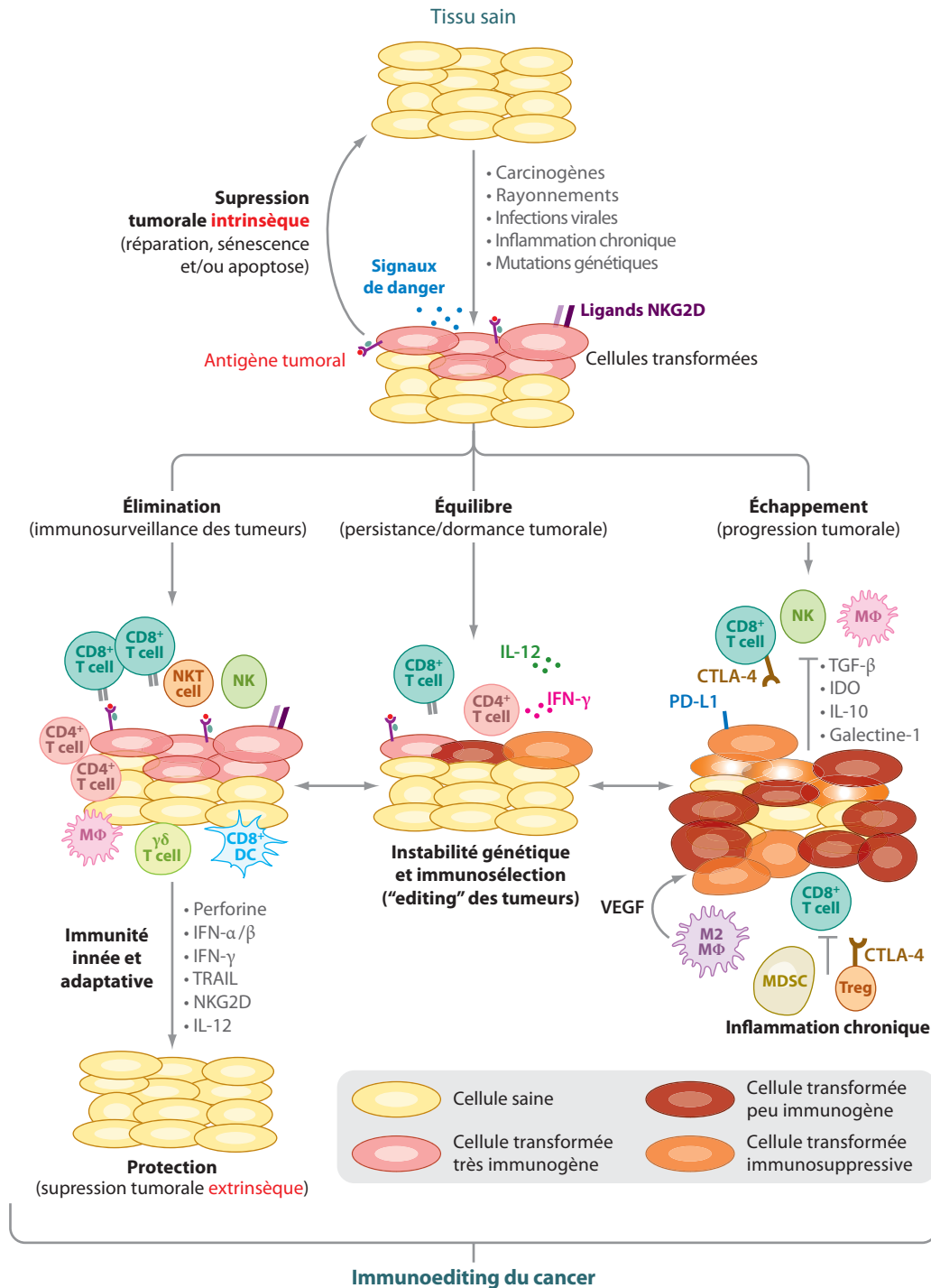
### 1.3. De l'émergence de la controverse à la renaissance du concept

Bien que de multiples arguments expérimentaux et cliniques apportent de solides preuves en faveur d'une immunosurveillance, il apparaît que la réponse immunitaire antitumorale soit souvent inefficace ou insuffisante à la complète résolution d'un cancer. Ainsi, des variants résistants à la réponse immune émergent au sein des tumeurs. Ces variants

constituent un obstacle important pour l'efficacité des protocoles d'immunothérapie antitumorale.

Le concept d'immunosurveillance est en effet devenu sujet à controverse suite à l'impossibilité d'établir un consensus reliant une incidence accrue de tumeurs chez des hôtes dont le statut immunitaire était compromis. En effet, si le système immunitaire est défaillant, ne devrait-il pas y avoir une plus forte incidence tumorale ? Cette remise en question vient après la démonstration faite par Osias Stutman d'une absence de différence significative entre souris immunodéficientes et leurs homologues sauvages concernant (i) le délai d'apparition de tumeurs (qu'elles soient de nature spontanée non viro-induite ou induites chimiquement) et (ii) la fréquence d'apparition des tumeurs chez ces souris (Stutman, 1974). Des observations similaires ont par ailleurs appuyé ces conclusions à l'époque (Rygaard and Povlsen, 1974a, b). L'état actuel des connaissances permet de discuter ces résultats basés sur des modèles imparfaits d'immunodéficiences, comme l'est par exemple la souris athymique *Nude* CBA/H, dont on sait aujourd'hui qu'elle n'est pas totalement dépourvue de lymphocytes fonctionnels, disposant notamment de cellules  $T\alpha\beta$ ,  $T\gamma\delta$  et NK dont le développement est indépendant du thymus. Il a en outre été démontré depuis que l'expression de l'isoforme la plus active d'une enzyme (aryl-hydroxylase) rendait ce modèle *Nude* CBA/H plus sensible à l'induction chimique de tumeurs (Heidelberger, 1975). De même, le temps moyen d'observation, allant de 3 à 7 mois, était rétrospectivement trop court pour voir survenir l'apparition de tumeurs spontanées et conclure à ce sujet. Le manque de connaissances en matière d'immunologie appliquée aux modèles d'immunodéficiences expérimentales a ainsi largement contribué à l'abandon de l'hypothèse d'une immunosurveillance du cancer, mais aurait pu conduire à la réécriture si ce n'est à la réinterprétation de ces conclusions comme évoqué par certains de leurs pairs (Penn, 1974; Thomas, 1982).

Ce concept n'a été réinvesti que dans les années 1990, où l'identification et la caractérisation moléculaire du premier antigène tumoral chez l'Homme par le groupe de Thierry Boon ont constitué une étape décisive pour l'immunologie des tumeurs (van der Bruggen *et al.*, 1991). Ces travaux ont abouti à un consensus sur le potentiel immunogène des tumeurs. Parallèlement, il a été clairement démontré par le groupe de Robert D. Schreiber que l'IFN- $\gamma$  endogène jouait un rôle primordial contre l'apparition de cancers chez



**Figure 1. Le concept d'immunoediting des cancers.**

Dans ce concept, la progression tumorale semble sous le contrôle séquentiel de trois phases distinctes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. L'immunoediting assimile le concept d'immunosurveillance à une phase de détection et d'éradication des tumeurs, appelée phase d'élimination, où coopèrent les réponses immunes innée et adaptative. Elle est suivie par une longue période de latence, dite d'équilibre, qui n'implique que les effecteurs de l'immunité adaptative. Le phénotype immunogène de la tumeur y est constamment façonné par les contraintes immunologiques environnantes, donnant naissance à des variants tumoraux génétiquement instables. Ces variants émergents peu immunogènes acquièrent une insensibilité suffisante pour échapper à l'élimination par les cellules effectrices et/ou induisent un état de tolérance immunologique favorable à l'expansion tumorale dans son microenvironnement. À l'issue du processus d'équilibre, les cellules tumorales entrent dans la phase d'échappement, esquivant totalement la surveillance et la pression exercées par le système immunitaire. C'est à ce stade de croissance incontrôlée que la tumeur devient cliniquement apparente. D'après (Vesely *et al.*, 2011).

les souris immunocompétentes (Kaplan *et al.*, 1998). La neutralisation de l'IFN- $\gamma$  ou de son récepteur entraîne effectivement une susceptibilité accrue des souris au 3'-méthylcholanthrène (MCA), puissant agent carcinogène. En 2001, Shankaran *et al.* ont ensuite établi que le système immunitaire était non seulement capable d'influer sur le développement de la tumeur mais également sur son immunogénicité (Shankaran *et al.*, 2001). En effet, une proportion importante de tumeurs, soit 40%, dérivées de souris immunodéficientes (*Rag2*<sup>-/-</sup>) initialement induites par MCA sont spontanément rejetées après transfert à des hôtes naïfs immunocompétents. Ces résultats ont mis en évidence le rôle du système immunitaire sur le remodelage des tumeurs par pression de sélection et amené à l'introduction d'un nouveau concept : l'immunoediting du cancer (Dunn *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2004).

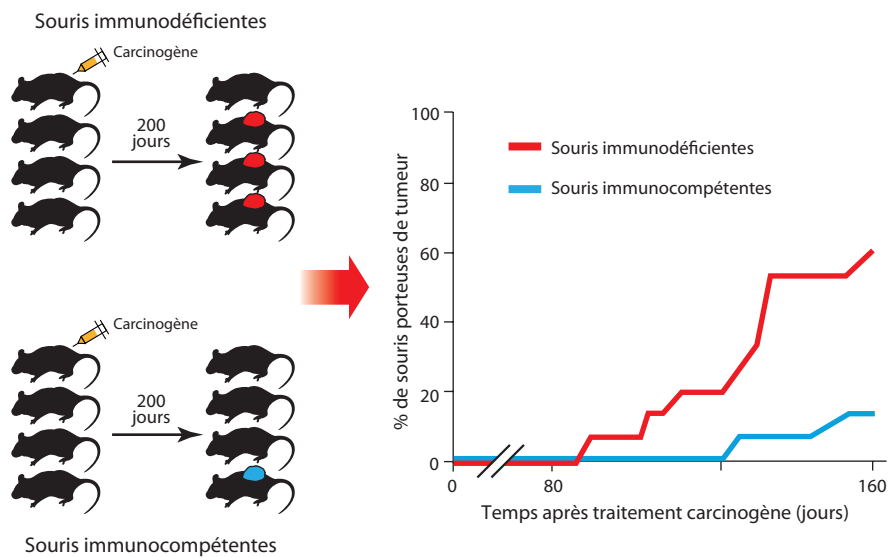
## 2. Révision du concept : la notion d'immunoediting du cancer

Le concept d'immunoediting est un processus dynamique qui définit les relations entre système immunitaire et cellules tumorales ; il comprend trois phases distinctes qui se succèdent : i) l'élimination, ii) l'équilibre, iii) l'échappement (*Figure 1*, p. 26). La notion d'immunoediting apporte une meilleure compréhension des effets paradoxaux de l'immunité de l'hôte à la fois sur l'élimination et sur la progression des tumeurs, permettant ainsi d'expliquer l'occurrence de cancers chez des hôtes immunocompétents.

### 2.1. La phase d'élimination : coopération des réponses immunes innée et adaptative

La phase d'élimination reprend le concept d'immunosurveillance, au cours de laquelle les réponses immunitaires innée et adaptative coopèrent pour déceler les transformations malignes précoces et les éliminer.

Comme évoqué précédemment, de nombreuses constatations expérimentales murines soutiennent l'évidence d'une veille immunitaire à l'encontre de lésions précancéreuses émergentes ou cancéreuses avérées. Il existe trois modèles standards de cancer murin illustrant le rôle de l'immunité dans l'élimination des tumeurs : les tumeurs induites par un



**Figure 2. Schéma expérimental illustrant l'influence du statut immunitaire de souris sur leur susceptibilité à l'induction tumorale par un agent carcinogène.**

De nombreuses études ont établi que les modèles immunodéficients étaient plus enclins que ceux immunocompétents à développer des tumeurs après traitement par un carcinogène tel que le MCA. Des observations similaires ont été constatées quant à l'incidence de tumeurs spontanées. Les souris immunodéficientes sur lesquelles reposent ces expériences ont soit été génétiquement modifiées pour compromettre les composants de l'immunité innée et/ou adaptative, soit fait appel à des animaux sauvages rendus immunodéficients après administration chronique d'anticorps monoclonaux déplétant par exemple les sous-populations T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ou l'IFN- $\gamma$ . Adapté de (Schreiber *et al.*, 2011).



carcinogène, les tumeurs spontanées survenant avec l'âge et le développement de tumeurs chez des souris génétiquement prédisposées au cancer. De ce fait, l'exposition de nombreux modèles murins d'immunodéficience bien définie à ces carcinogènes a permis de tester puis de valider l'hypothèse d'une immunosurveillance des tumeurs (*Figure 2*, p. 28). Les animaux présentant un système immunitaire altéré par manipulation génétique développent en effet plus de tumeurs spontanées ou induites par un carcinogène que les animaux immunocompétents (*Tableau 2*, p. 30).

Il a ainsi été clairement démontré que les composantes innée et adaptative du système immunitaire étaient impliquées dans les processus d'élimination et d'immunoédition des tumeurs. Parmi les différents acteurs de l'immunosurveillance, on peut citer : i) les molécules et les cellules effectrices de l'immunité innée telles que les cellules *Natural Killer* (NK) (Borg *et al.*, 2004), les cellules dendritiques (DC) (Stary *et al.*, 2007), TRAIL (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) (Wiley *et al.*, 1995) et le système perforine/granzymes (Trapani and Smyth, 2002) ; ii) les cellules de l'immunité adaptative que sont les lymphocytes B et T CD4 et CD8 que nous aborderons en détail plus loin (Shankaran *et al.*, 2001) ainsi que iii) les lymphocytes T $\gamma\delta$  (Gao *et al.*, 2003) et les cellules *T Natural Killer* (NKT) (Crowe *et al.*, 2002) qui constituent des populations cellulaires à l'interface entre ces deux types de réponses immunes.

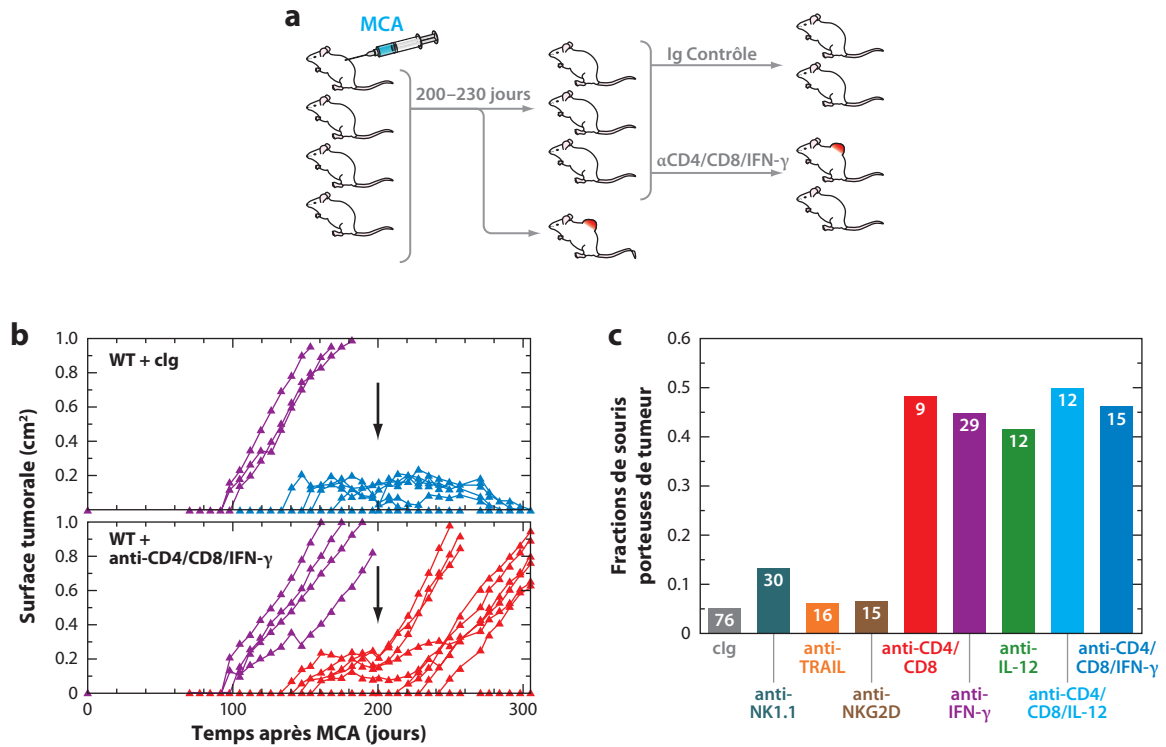
**Tableau 2. Susceptibilité de souris immunodéficientes au développement de tumeurs spontanées ou chimiquement induites. D'après (Vesely *et al.*, 2011)**

<i>Génotype</i>	<i>Déficit immunitaire</i>	<i>Observations</i>
<i>Rag2</i> <sup>-/-</sup>	Absence de LT, LB et cellules NKT	↗ sarcomes induits par MCA <b>Néoplasies intestinale et pulmonaire spontanées</b>
<i>Tcrb</i> <sup>-/-</sup>	Absence de LTαβ	↗ sarcomes induits par MCA
<i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup>	Absence de LTγδ	↗ sarcomes induits par MCA ↗ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA
<i>Nude athymique</i>	Absence de la plupart des LT	↗ sarcomes induits par MCA
<i>Ifngr</i> <sup>-/-</sup>	Insensibilité à l'IFN-γ	↗ sarcomes induits par MCA
<i>Ifng</i> <sup>-/-</sup>	Absence d'IFN-γ	↗ sarcomes induits par MCA ↗ lymphomes induits par MNU <b>Lymphomes (C57BL/6) et adénocarcinomes pulmonaires (BALB/c) spontanés</b>
<i>Stat1</i> <sup>-/-</sup>	Insensibilité aux IFNs α/β et γ	↗ sarcomes induits par MCA
<i>Pfp</i> <sup>-/-</sup>	Absence de perforine	↗ sarcomes induits par MCA <b>Lymphomes B spontanés</b>
<i>Il12a</i> <sup>-/-</sup>	Absence d'IL-12	↗ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA ↗ lymphomes induits par MNU
<i>Il23a</i> <sup>-/-</sup>	Absence d'IL-23	↘ sarcomes induits par MCA ↘ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA
<i>Cd80</i> <sup>-/-</sup> <i>Cd86</i> <sup>-/-</sup>	Absence de CD80 et CD86	↗ tumeurs cutanées induites par rayonnement UV
<i>RAE1 Tg</i>	Signalisation NKG2D défectueuse	↗ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA
<i>Traif</i> <sup>-/-</sup>	Absence de TRAIL	↗ sarcomes induits par MCA <b>Lymphomes spontanés</b>
<i>Myd88</i> <sup>-/-</sup>	Absence de Myd88	↘ sarcomes induits par MCA ↘ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA
<i>Il10</i> <sup>-/-</sup>	Absence d'IL-10	↘ sarcomes induits par MCA
<i>Il1b</i> <sup>-/-</sup>	Absence d'IL-1β	↘ sarcomes induits par MCA
<i>Il17a</i> <sup>-/-</sup>	Absence d'IL-17A	↘ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA
<i>Déplétion</i>	<i>Déficit immunitaire</i>	<i>Observations</i>
<i>Ac anti-NK1.1</i>	Absence de cellules NK et NKT	↗ sarcomes induits par MCA
<i>Ac anti-TRAIL</i>	Blocage de TRAIL	↗ sarcomes induits par MCA
<i>Ac anti-CD4, anti-CD25 ou anti-FR4</i>	Absence de cellules Treg	↘ sarcomes induits par MCA

Les processus d'élimination des cellules tumorales font appel à différents mécanismes employés par les cellules immunitaires. Une fois activées, ces dernières peuvent exercer une fonction cytotoxique directe sur les cellules néoplasiques. Les mécanismes de lyse des cellules tumorales reposent sur la libération de granules cytotoxiques de perforine/granzymes et l'activation de récepteurs à domaine de mort médiée par leurs ligands que sont FasL, TRAIL ou le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ).

Outre cette activité cytotoxique, les cellules NK, NKT et les LT peuvent produire des cytokines ayant une action antitumorale plus ou moins directe. Parmi ces cytokines, l'IFN- $\gamma$  est depuis longtemps reconnu comme une cytokine majeure de l'immunité antitumorale naturelle (Kaplan *et al.*, 1998). Cette cytokine exerce une action antiproliférative (Bromberg *et al.*, 1996) ou pro-apoptotique (Xu *et al.*, 1998) directe sur les cellules tumorales. De plus, l'IFN- $\gamma$  augmente l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) sur les cellules tumorales et facilite ainsi leur reconnaissance par les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs (Kaplan *et al.*, 1998). D'autres cytokines sont cruciales pour l'établissement de réponses antitumorales efficaces, notamment les IFNs de type I : IFN- $\alpha$  et  $\beta$  (Dunn *et al.*, 2005; Swann *et al.*, 2007). Dans un contexte tumoral, l'IFN- $\alpha/\beta$  est capable d'agir sur les cellules dendritiques pour faciliter la présentation croisée d'antigènes (Le Bon *et al.*, 2003) et la genèse de réponses humorales (Le Bon *et al.*, 2001). L'IFN- $\alpha/\beta$  accroît la survie des LT activés (Marrack *et al.*, 1999) et favorise l'expression de TRAIL par les cellules NK (Sato *et al.*, 2001). L'IFN- $\alpha/\beta$  peut enfin avoir un effet angiostatique, en limitant entre autres, la motilité des cellules endothéliales (Kerbel and Folkman, 2002).

L'ensemble de ces études supporte le concept selon lequel le système immunitaire est capable de détecter et d'éliminer des cellules tumorales émergentes. Cette étape constitue une fin en soi lorsqu'elle aboutit à l'éradication de tumeurs naissantes. Il est toutefois possible que certaines cellules tumorales résistent à l'action cytotoxique du système immunitaire. On entre alors dans une phase d'équilibre.



**Figure 3. Preuve expérimentale de l'existence de la phase d'équilibre au cours de l'immunoediting du cancer.**

**a)** Protocole mis en place pour tester l'hypothèse que les tumeurs sont maintenues à l'état de dormance par l'immunité adaptative (Koebel *et al.*, 2007). **b)** Des souris C57BL/6 immunocompétentes ont été traitées par 25  $\mu$ g de MCA et la croissance tumorale a été suivie. Au jour 200, les souris ne présentant pas de tumeurs (soit près de 80%) ont soit reçu une injection hebdomadaire d'immunoglobulines contrôles soit été traitées à la même fréquence par des anticorps monoclonaux anti-CD4/CD8/IFN- $\gamma$ . Les cellules tumorales sont d'abord majoritairement maintenues à un état de quiescence chez ces animaux immunocompétents puis progressivement amenées à se développer selon que leur immunogénicité est plus ou moins modifiée par les contraintes immunologiques environnementales. Les profils de croissance distinguent les tumeurs dont l'expansion conduit à l'émergence de masses stables (en bleu), des variants tumoraux « édités » par le système immunitaire évoluant sous forme de carcinome (en violet et en rouge). **c)** Histogramme représentant les fractions de souris initialement traitées par MCA développant des tumeurs tardives après déplétion sélective des composants cellulaire et/ou moléculaire des systèmes immunitaires inné et adaptatif. Les tumeurs d'abord maintenues à l'état d'équilibre (dormance cellulaire) évoluent uniquement sous forme de sarcome chez les souris traitées par MCA puis par des anticorps ciblant les effecteurs de l'immunité adaptative (IL-12, IFN- $\gamma$ , cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>). Cela n'est pas observé après déplétion des composants de l'immunité innée (NK1.1, TRAIL et NKG2D). D'après (Vesely *et al.*, 2011).

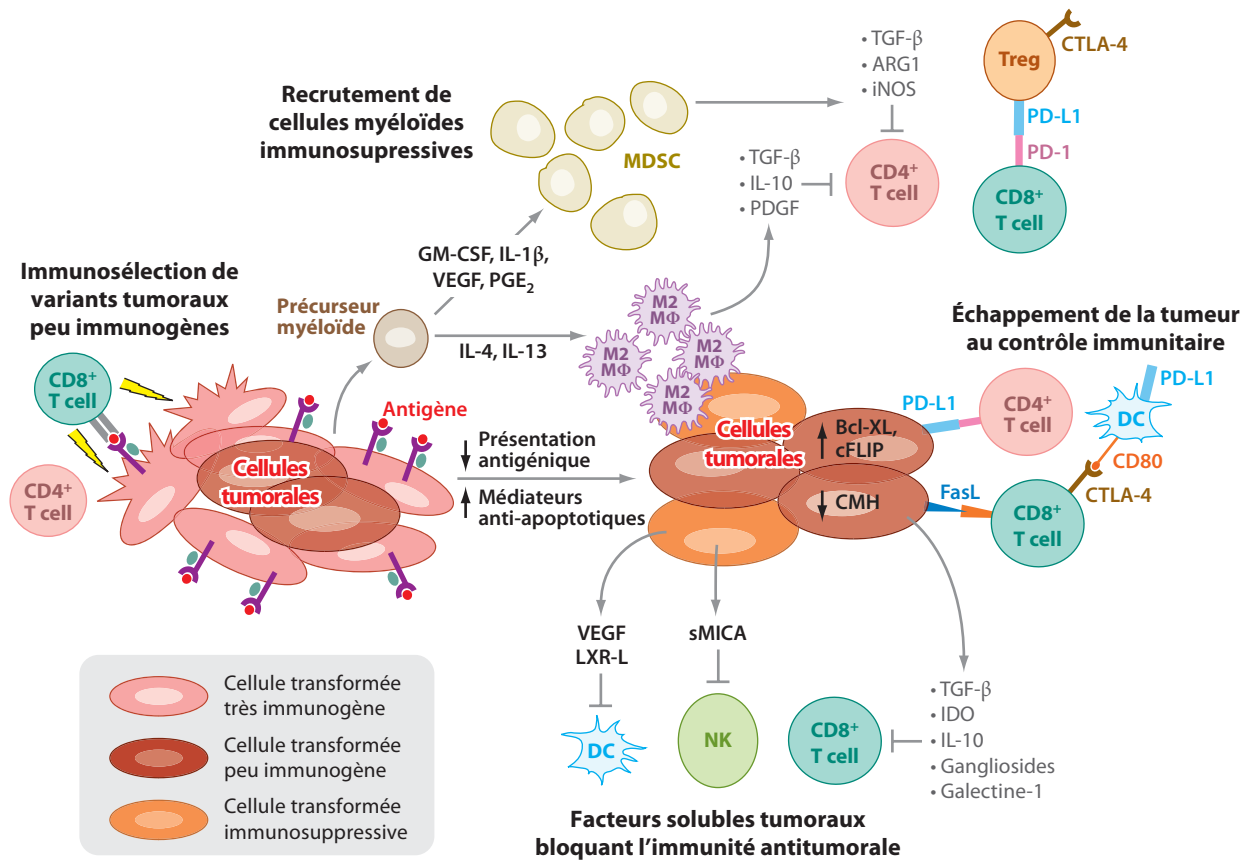
## 2.2. La phase d'équilibre : entre dormance tumorale et pression de sélection de l'immunité adaptative

La phase d'équilibre suppose donc la persistance de cellules tumorales malgré la surveillance opérée par le système immunitaire. Au cours de cette phase, le système immunitaire adaptatif exerce une pression sélective qui va permettre d'éliminer les cellules sensibles à son action mais entraîne la sélection de cellules tumorales capables de résister à la destruction par le système immunitaire (Koebel *et al.*, 2007). Les cellules tumorales ainsi sélectionnées ne peuvent plus être contrôlées par le système immunitaire de l'hôte et progresseront donc à ses dépens.

La formulation de cette idée a fait suite aux expériences menées par Shankaran *et al.* Des tumeurs issues de souris sauvages se développent progressivement après transplantation chez des souris immunodéficientes tandis qu'un rejet spontané de tumeurs issues d'animaux immunodéprimés est constaté après transfert chez des hôtes immunocompétents pour 40% d'entre eux (Shankaran *et al.*, 2001). Ces observations suggèrent pour la première fois un contrôle de l'immunogénicité des tumeurs par le système immunitaire : les tumeurs dérivant d'un hôte dont l'immunité est compromise sont plus immunogènes que celles provenant d'un hôte où l'immunité est fonctionnelle.

Des travaux ultérieurs ont ensuite établi la preuve de ce concept chez la souris (Koebel *et al.*, 2007) (*Figure 3*, p. 32). Les cellules néoplasiques à l'équilibre entrent dans un état de quiescence où elles demeurent cliniquement indécélables (Aguirre-Ghiso, 2007). Ceci explique que la phase d'équilibre soit la plus longue des trois étapes décrites par l'immunoediting des tumeurs, pouvant persister plusieurs années chez l'Homme. Ces cellules tumorales en dormance sont en fait placées sous le contrôle de l'immunité adaptative qui les contient sans toutefois parvenir à les éradiquer totalement. Ceci mène à l'émergence de variants tumoraux peu immunogènes et insensibles aux attaques par le système immunitaire : on parle alors d'immunosélection de clones tumoraux résistants. En effet, le phénotype immunogène d'une tumeur est constamment façonné par les contraintes immunologiques environnantes, même après l'émergence de variants résistants. La pression de sélection constante conduira finalement à l'immunorésistance de la tumeur.

Des arguments cliniques sous-tendent également cette étape d'équilibre au cours de l'immunoediting du cancer. L'existence d'une réponse immunitaire contre les cellules pré-néoplasiques a été rapportée dans les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (GMSI) ou dans les myélomes indolents (Dhodapkar, 2005). La progression de ces cellules précancéreuses est initialement contenue par la réponse à médiation cellulaire T mais se trouve plus tard tenue en échec. Ainsi, même après une vaste période de latence, l'évolution lente de ces clones anormaux vers une hémopathie maligne lymphoïde (principalement un myélome multiple) est compatible avec cette étape d'équilibre. Du reste, nombre d'observations cliniques suggèrent que les cancers puissent rester à l'état quiescent pendant de nombreuses années avant que la pathologie maligne ne progresse à des niveaux cliniquement décelables (Meng *et al.*, 2004). A titre d'exemple, 20 à 45% de patients atteints de cancers mammaire ou prostatique rechutent souvent des décennies plus tard (Karrison *et al.*, 1999; Weckermann *et al.*, 2001). Le délai prolongé entre rémission du cancer initial et récurrence peut donc en partie s'expliquer par les contraintes immunologiques exercées sur les cellules néoplasiques persistantes. Les forts taux de morbidité et mortalité associés au cancer sont imputables aux lésions métastatiques provenant de cellules souches cancéreuses (Jordan *et al.*, 2006), d'où l'enjeu crucial à considérer cette pathologie cancéreuse résiduelle. Enfin, le dernier scénario clinique qui démontre selon toute vraisemblance l'existence de ce processus d'équilibre chez l'Homme est la transmission de tumeurs de donneurs d'organes à des individus receveurs à l'issue d'une greffe (Mackie *et al.*, 2003). L'immunodéficience des personnes transplantées faciliterait donc la croissance rapide et progressive des tumeurs initialement maintenues en équilibre par le système immunitaire efficace des donneurs.



**Figure 4. Mécanismes d'échappement tumoral à l'attaque immunologique.**

Sous l'effet de la pression de sélection immunologique constante, l'équilibre préalablement établi entre cellules immunes et tumorales se brise et conduit à la progression tumorale. Au travers de l'immunosélection, les cellules tumorales immunogènes sont éliminées tandis que des clones tumoraux agressifs émergent. L'instabilité génétique de ces variants promeut la perte d'expression des antigènes tumoraux par le CMH-I et conduit à l'acquisition de propriétés immuno-évasives. Peu à peu, les cellules tumorales développent des mécanismes d'immunosubversion pour contourner les défenses immunitaires. Le défaut de présentation antigénique (CMH-I), la surexpression de molécules de surface immunosuppressives cytotoxiques (PD-L1, FasL) constituent les stratégies inhérentes aux cellules tumorales. De plus, les cellules néoplasiques sécrètent des facteurs solubles immunosuppresseurs (TGF-β, IL-10, VEGF, LXR-L, IDO, gangliosides ou MICA soluble) ou encore recrutent des cellules régulatrices (MDSC) pour générer un microenvironnement immunosuppresseur (IL-4, IL-13, GM-CSF, IL-1β et PGE<sub>2</sub>). Une fois recrutées, les MDSC atténuent l'immunité antitumorale en relarguant des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-4 et l'IL-13 qui conduisent au recrutement de précurseurs myéloïdes et à leur polarisation en macrophages M2 (MΦ M2). Les MΦ M2 produisent alors du TGF-β, de l'IL-10 et du PDGF qui inhibent les LT. L'accumulation des MDSC conduit à la répression des fonctions effectrices cellulaires T via l'expression de TGF-β, d'ARG1 et d'iNOS. Les Treg peuvent également inhiber les fonctions des CTL notamment grâce à l'expression de CTLA-4. D'après (Vesely *et al.*, 2011).

### 2.3. La phase d'échappement : l'échec de l'immunosurveillance des tumeurs

À l'issue du processus d'équilibre, une tumeur pourrait ainsi complètement esquiver la surveillance et la pression exercées par le système immunitaire pour entrer dans la phase ultime : l'échappement. Au cours de cette dernière, les variants résistants se développent dans un environnement immunologiquement intact. Cette rupture de l'équilibre préalablement établi entre cellules immunes et tumorales se produit lorsque les altérations génétiques et épigénétiques ont conféré à ces variants tumoraux une insensibilité suffisante pour se soustraire au contrôle par le système immunitaire, mais aussi lorsque la tumeur induit un état de tolérance immunologique favorable à son expansion. Une conséquence importante du concept d'immunoediting est l'immunorésistance intrinsèque de la plupart des tumeurs se développant chez un individu immunocompétent, après acquisition des caractéristiques leur permettant d'échapper à l'immunosurveillance (*Figure 4, p. 35*).

#### i) Immunosélection

Résultat de la pression de sélection immunologique constante, les cellules tumorales élaborent une série de stratégies pour contourner l'immunosurveillance appelées immunosélection. Les cellules transformées échappent ainsi à la reconnaissance par l'immunité innée et adaptative.

L'échappement tumoral à la lyse induite par les LT cytotoxiques (CTL) est le plus souvent associé à des altérations de présentation antigénique par les molécules du CMH-I à la surface des cellules tumorales. L'expression des antigènes tumoraux par les cellules néoplasiques est souvent hétérogène, même au sein de tumeurs de même type histologique. Une moindre expression de ces antigènes est souvent corrélée à une progression de la maladie. Ainsi, la perte totale d'expression d'antigènes tumoraux a été décrite comme un mécanisme majeur d'échappement tumoral à la réponse immunitaire (Jager *et al.*, 1996) et a été particulièrement bien démontré dans le cas du mélanome où l'échappement à la lyse s'explique par la génération de variants tumoraux ne présentant pas le peptide antigénique dominant contre lequel la réponse spécifique s'est établie (Yee *et al.*, 2002). De plus, la perte d'expression des molécules du CMH-I est observée dans divers types de tumeurs tels que le mélanome (Khong *et al.*, 2004), le carcinome colorectal (Algarra *et al.*, 1997) ou le cancer du sein (Cabrera *et al.*, 1996). Cette déficience en CMH-I peut être



partielle résultant d'une mutation ponctuelle ou totale et liée à une anomalie de synthèse de la  $\beta$ 2-microglobuline (Restifo *et al.*, 1996). La diminution d'expression des molécules CMH-I est parfois liée à des défauts au niveau des gènes codant le CMH, l'apprêtement ou la présentation antigénique (Restifo *et al.*, 1993) ou encore du transport des peptides (Korkolopoulou *et al.*, 1996). Ces défauts de présentation antigéniques résultent de la perte de TAP1 (*Transporter associated with Antigen Processing 1*), LMP2 (*Low Molecular mass Polypeptide 2*) et LMP7. De telles altérations ont été rapportées dans nombreux cancers (œsophage, ORL, côlon, neuroblastome, poumon, sein, rein et mélanome).

D'autres mécanismes d'échappement sont élaborés par les cellules transformées pour éviter leur lyse par les cellules effectrices cytotoxiques. On peut citer des processus de résistance tumorale impliquant particulièrement la voie perforine/granzymes et la voie des domaines à récepteurs de mort (Gati *et al.*, 2003). Des travaux ont ainsi mis en évidence l'échappement à la lyse spécifique des tumeurs sur-exprimant l'inhibiteur de sérine protéase PI9 qui bloque le granzyme B (Bladergroen *et al.*, 2002; Medema *et al.*, 2001). De manière plus générale, différentes altérations des voies de signalisation pro-apoptotiques mitochondriales, fréquemment observées au niveau des cellules cancéreuses, sont susceptibles d'altérer la lyse tumorale induite par la voie perforine/granzymes. C'est par exemple le cas lors de la surexpression de Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra long*) (Hinz *et al.*, 2000). De même, il a été rapporté que des mutations ou des phénomènes de méthylation de gènes impliqués dans l'apoptose, la surexpression de cFLIP (*cellular FLICE-Like Inhibitory Protein*) un inhibiteur de la caspase 8 (Medema *et al.*, 1999) ou encore l'expression du récepteur leurre pour TRAIL par les cellules tumorales (Giovarelli *et al.*, 1999) permettaient à ces cellules transformées d'échapper à la lyse spécifique induite les effecteurs cytotoxiques. Enfin, des mécanismes associant résistance à l'apoptose et insensibilité accrue aux traitements ont été proposés. Ils concernent la surexpression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (Campos *et al.*, 1993; Weller *et al.*, 1995) ou encore l'expression ectopique de la survivine, un inhibiteur des caspases effectrices de la famille des *Inhibitor Apoptosis Protein* (IAP) (Altieri, 2010; Végran *et al.*, 2013b).

## ii) Immunosubversion

A côté des stratégies d'immunosélection, une opposition active à la réponse immunitaire antitumorale peut être mise en œuvre par les cellules tumorales et leur microenvironnement. Cette immunosubversion repose sur des mécanismes extrinsèques aux cellules tumorales et inhérents au microenvironnement de la tumeur ou à l'instauration d'une tolérance immunologique vis-à-vis de la tumeur.

### Par les cellules tumorales

La croissance incontrôlée des cancers malins, l'invasion des tissus de l'hôte et, par conséquent, l'apparition de métastases s'accompagnent de signaux pro-inflammatoires, généralement sous forme de sécrétion de cytokines et chémokines, principaux inducteurs des réponses innée et adaptative (Mantovani *et al.*, 2008). Malgré les conséquences inflammatoires et immunogènes potentielles de l'envahissement tumoral, le système immunitaire reste souvent tolérant vis-à-vis de l'établissement des cancers. En effet, les tumeurs sont capables de moduler les réponses inflammatoires chroniques empêchant ainsi la mise en place de la phase d'élimination et multipliant les processus de transformation et de croissance des cellules malignes.

L'activation de NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B*) au niveau des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs induit la production de diverses molécules pro-inflammatoires, dont certaines promeuvent la prolifération des tumeurs et leur confèrent un effet anti-apoptotique (Karin and Greten, 2005). Il s'agit des cytokines que sont le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) et des chémokines telles que l'IL-8. De plus, l'induction de la signalisation de NF- $\kappa$ B peut dans certains cas conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène, de monoxyde d'azote (NO) ou de peroxy-nitrites (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) imposant un stress oxydatif aux cellules tumorales adjacentes à caractère tumoricide ou au contraire carcinogène *via* l'induction de dommages à l'ADN. La réponse inflammatoire chronique associée aux tumeurs promeut alors le développement tumoral.

L'expression par les cellules tumorales de facteurs solubles immunosuppresseurs tels que le TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ), l'IL-10, le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) tend à supprimer les fonctions des DC, à inactiver les cellules T et NK et à

promouvoir la vascularisation de la tumeur (Aruga *et al.*, 1997; Gabrilovich *et al.*, 1999; Wrzesinski *et al.*, 2007). La production de formes solubles de ligands des récepteurs NKG2D tels que sMICA (*soluble MHC Class I polypeptide-related sequence A*) a également été rapportée comme mécanisme d'immunosubversion. En effet, l'induction de sMICA s'amplifie progressivement à mesure que la tumeur se développe et inactive la réponse immune antitumorale dépendante des cellules T CD8 et NK (Sun *et al.*, 2005). Contrairement aux formes membranaires, les ligands solubles de NKG2D sont capables d'internaliser le récepteur (Holdenrieder *et al.*, 2006). En outre, la sécrétion de métabolites des stéroïdes, ligands de LXR- $\alpha$  (*Liver X Receptor  $\alpha$* ) perturbent précocement les fonctions présentatrices des DC par inhibition de leur récepteur CCR7 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 7*), les empêchant ainsi de migrer au ganglion lymphatique pour assurer leur fonction de présentation antigénique aux cellules T naïves (Villablanca *et al.*, 2010). La libération de la galectine peut quant à elle entraver l'activité et la survie cellulaire T (Rubinstein *et al.*, 2004). De surcroît, l'expression de FasL ou PD-L1 (*Programmed cell Death 1 Ligand 1*) sur les cellules tumorales provoque l'apoptose des LT activés (Dong *et al.*, 2002; Hahne *et al.*, 1996; Topalian *et al.*, 2012). Par ailleurs, les cellules tumorales peuvent exercer une activité supraphysiologique de l'arginase 1 (ARG1), épuisant ainsi le milieu environnant en arginine essentielle aux cellules T, ce qui se traduit par l'inhibition des principales fonctions lymphocytaires T (Bronte and Zanovello, 2005). La dégradation du tryptophane par l'indéolamine 2,3-dioxygénase (IDO), enzyme constitutivement exprimée par certaines cellules tumorales ou environnantes, favorise l'immunosuppression de la tumeur. La carence en tryptophane localisée au site tumoral bloque la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> (Uyttenhove *et al.*, 2003) et induit l'apoptose des LT CD4<sup>+</sup> consécutivement à l'accumulation en kynurénines (Terness *et al.*, 2002).

Enfin, la voie oncogène de signalisation STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) permet la modulation du système immunitaire et l'invasion tumorale (Rebe *et al.*, 2013). STAT3 est exprimée de manière constitutive dans les cellules tumorales où elle réprime l'inflammation, favorise la prolifération cellulaire et prévient l'apoptose (Bowman *et al.*, 2001; Niu *et al.*, 2002). De plus, l'activation persistante de STAT3 est associée à une angiogenèse favorisée et à une plus forte dissémination métastatique dans diverses tumeurs humaines, tout en inhibant l'immunité antitumorale. STAT3

transactive les gènes cibles du processus de transformation, comme les gènes régulant le cycle cellulaire, les gènes pro-angiogéniques (codant notamment le VEGF) et anti-apoptotiques. STAT3 prévient la mobilisation des cellules immunitaires effectrices en inhibant la sécrétion de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\beta$  ou de la chémokine CCL5 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 5*) par les cellules néoplasiques (Wang *et al.*, 2004).

### Par les cellules immunosuppressives

Les cellules immunitaires environnant la tumeur sont elles aussi subverties, orientées de sorte à ce que s'installe une tolérance immunologique de la tumeur.

Conséquence directe de la sécrétion d'IL-6 par les cellules tumorales dans leur environnement, la voie de signalisation STAT3 peut être engagée au niveau des cellules immunes avoisinantes. L'activation de STAT3 au sein de précurseurs myéloïdes immatures recrutés au site tumoral entraîne d'une part leur polarisation en cellules myéloïdes suppressives MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cell*) et prévient d'autre part leur différenciation en DC présentatrices d'antigènes, et par conséquent la mise en place d'une réponse T spécifique (Gabrilovich *et al.*, 2007; Kusmartsev and Gabrilovich, 2006; Menetrier-Caux *et al.*, 1998; Zea *et al.*, 2005). Les MDSC libèrent à leur tour de l'IL-6 et de l'IL-10 (entre autres molécules) qui pourront alors agir de manière autocrine sur la phosphorylation de STAT3. Une boucle de rétrocontrôle positif est alors établie et en partie responsable du potentiel immunosuppresseur des MDSC (Chalmin *et al.*, 2010). Des mécanismes impliquant des contacts cellulaires directs ou la sécrétion d'espèces oxydantes toxiques (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) participent également à l'action immunosuppressive des MDSC en inhibant l'activation des LT. La production de molécules protumorales comme ARG1 et IDO par les MDSC est notamment impliquée dans l'inhibition de la réponse Th1 (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Muller *et al.*, 2008). L'accumulation de MDSC a par ailleurs été observée dans les ganglions lymphatiques de souris porteuses de tumeurs (Kuzin *et al.*, 2004) ou dans le sang de patients atteints de cancers et corrélée à la progression tumorale (Pinzon-Charry *et al.*, 2005).

Au sein de l'infiltrat leucocytaire des tumeurs solides, les macrophages font très souvent partie des cellules immunes les plus fréquentes. Leur recrutement au lit tumoral est médié par les interleukines 4 et 13. Ils ont été décrits chez l'Homme comme infiltrant les cancers du côlon, du rein, du poumon, de l'ovaire et du sein ainsi que les mélanomes (Youn and

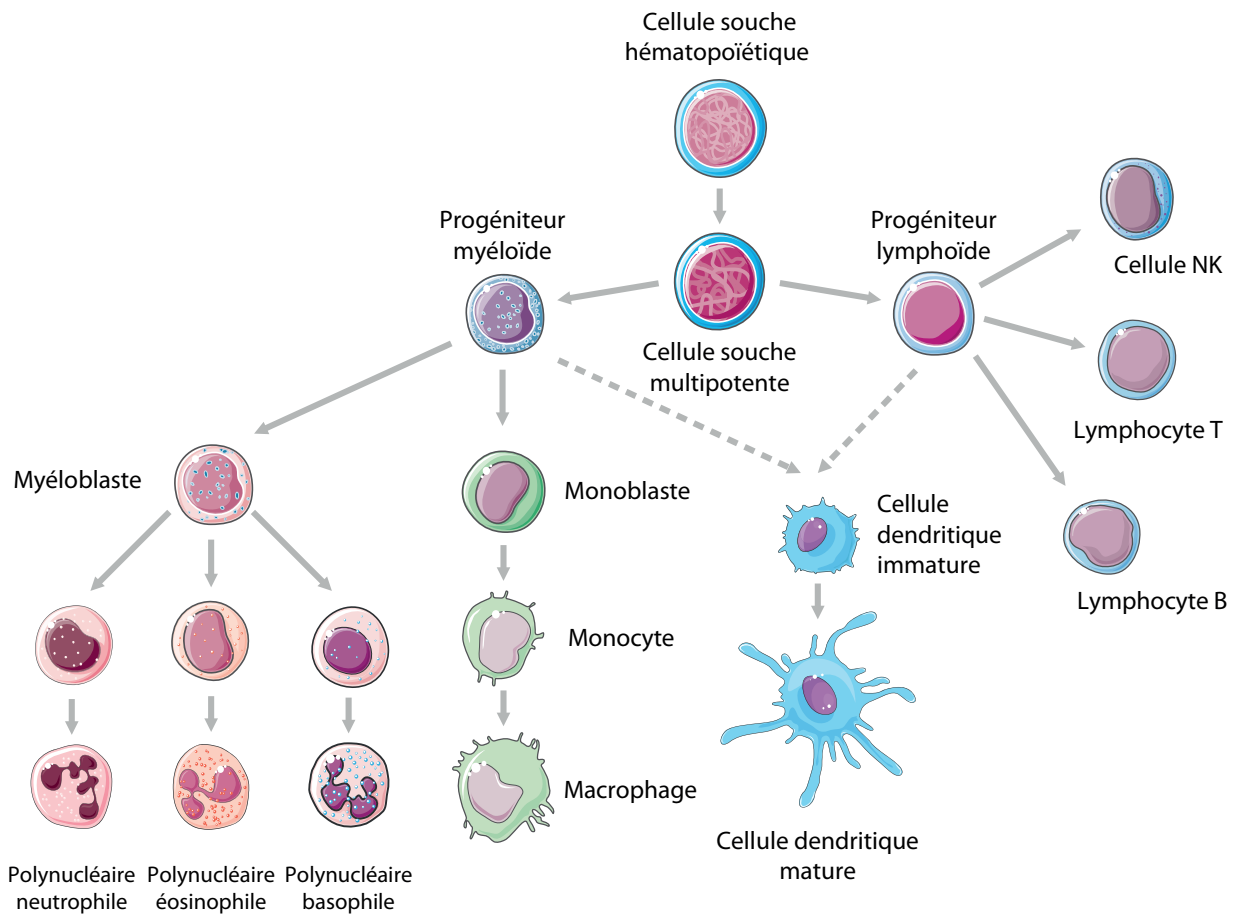
Gabrilovich, 2010). Les macrophages associés aux tumeurs ou TAM (*Tumor-Associated Macrophage*) expriment plus volontiers un phénotype de type M2 (M $\Phi$  M2), à savoir producteur de TGF- $\beta$ , d'IL-10, de la prostaglandine E2 (PGE2), d'ARG1 et du VEGF et de peu d'IL-12 ou d'IL-23. Ils favorisent donc plutôt une polarisation Th2 de la réponse immunitaire (Sica *et al.*, 2000), l'angiogenèse tumorale (Leek *et al.*, 2002) et sont globalement tolérogènes donc défavorables au rejet de la tumeur (Mantovani *et al.*, 2008). De même, les TAM de phénotype M2 supportent la prolifération, la survie et la migration tumorale en contribuant au remodelage du stroma *via* la sécrétion de facteurs de croissance comme le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et des molécules dégradant la matrice extracellulaire (Mantovani *et al.*, 2002; Sica *et al.*, 2008).

Enfin, les cellules Tr1, Treg et Th17, toutes d'origine lymphocytaire T CD4, peuvent également être subverties par la tumeur et s'accumuler. Le prochain chapitre est entièrement consacré à la description de ces cellules et à leur implication dans l'immunité antitumorale.

Ainsi, l'immunosubversion implique tant des sous-populations cellulaires que des facteurs solubles responsables de l'induction d'une réponse immune de type tolérogène à l'égard de la tumeur (Meloni *et al.*, 2006).

En conclusion, plusieurs données expérimentales et cliniques valident l'existence du concept d'immunosurveillance des cancers qui stipule que le système immunitaire détruit les cellules malignes émergentes, prévenant ainsi le développement de tumeurs. En réalité, l'immunité de l'hôte a vraisemblablement des effets paradoxaux sur la progression tumorale. Elle façonne la nature intrinsèque des tumeurs nouvellement formées par des contraintes immunologiques exercées par l'immunosurveillance antitumorale, induisant l'émergence de variants résistants.

Au sein du microenvironnement tumoral cohabitent des effecteurs immunitaires qui exercent un rôle protecteur, visant à freiner la progression tumorale, et des éléments ayant une action immunosuppressive favorisant le développement tumoral. La connaissance de ces différents acteurs est indispensable en recherche thérapeutique anticancéreuse, afin de cibler des mécanismes d'action pouvant soit intensifier le rôle des effecteurs antitumoraux, soit freiner l'action des éléments immunosuppresseurs.



**Figure 5. Représentation schématique de l'hématopoïèse aboutissant à la génération des principales composantes cellulaires de l'immunité innée et adaptative.**

Les cellules souches hématopoïétiques sont pluripotentes et donnent naissance à des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes au niveau des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus) dont dérivent plusieurs populations cellulaires. Concernant les effecteurs des réponses adaptatives, l'ontogénie des lymphocytes T s'achève en périphérie au niveau des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate...) tandis que les lymphocytes B sont matures dans le thymus.

## II. Les lymphocytes T CD4 et l'immunité antitumorale

### 1. Généralités sur la mise en place de la réponse immune innée et adaptative

Les cellules et médiateurs du système immunitaire interagissent entre eux au cœur d'un réseau dynamique, afin d'assurer à l'organisme une protection continue contre les agressions, tout en maintenant la tolérance vis-à-vis du « soi ». La réponse immunitaire innée (ou naturelle) constitue la première ligne de défense et fait intervenir des barrières physiques (épithélia digestif, bronchique et urogénital), une composante cellulaire ainsi qu'une composante humorale (le complément). La réponse immunitaire innée s'établit rapidement mais elle est transitoire et peu spécifique. Elle est suivie d'une réponse immune adaptative (ou spécifique) qui se caractérise par une mémoire immunologique permettant une destruction plus efficace et plus rapide lors d'un second contact avec le même agent pathogène. La plupart des cellules effectrices de la réponse immunitaire sont schématiquement représentées *Figure 5*, p. 43.

#### 1.1. Les effecteurs de la réponse innée

Les cellules de la réponse immunitaire innée comptent plusieurs catégories : i) les phagocytes que sont les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles ; ii) les cellules NK ; iii) les mastocytes et iv) les cellules résidentes qui présentent un CMH-I et expriment les IFNs. Toutes expriment des récepteurs de surface dits PRR (*Pattern-Recognition Receptors*) par le biais desquels elles reconnaissent certains motifs moléculaires conservés nommés PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), absents à la surface des cellules du soi. Les PRR sont impliqués soit dans la reconnaissance (récepteurs *scavenger*, lectines de type C), soit dans l'activation cellulaire (TLR ou *Toll-Like Receptors*, hélicases, molécules NOD) en réponse aux PAMP (Kumar *et al.*, 2011; Medzhitov, 2001; Takeuchi and Akira, 2010)(*Tableau 3*, p. 48)<sup>1</sup>. La sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et la présentation antigénique sont alors augmentées, induisant l'amplification du recrutement et de l'activation lymphocytaire (Akira and Takeda, 2004). De même, l'activation du complément induit le recrutement de cellules de la réponse innée, *via* des interactions avec ses récepteurs et la lyse de cellules « anormales » (Walport, 2001). Ces

---

<sup>1</sup> TLR : *Toll-Like Receptor*, RLR : *RIG-I (Retinoic acid-Inducible gene-I)-Like Receptor*, NLR : *Nod-Like Receptor*, iE-DAP : Acide *meso*-DiAminoPimélique, MDP : MuramylDipeptide.



différentes voies d'activation de la réponse innée non seulement constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes, mais sont également impliquées dans l'activation et la modulation de réponses immunes plus spécifiques et adaptées (Belardelli and Ferrantini, 2002; Carroll, 2004).

Les DC sont présentes dans les différents tissus de l'organisme et se caractérisent par une grande hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle (Banchereau et al., 2000). Chez l'homme, de nombreuses publications suggèrent que des progéniteurs aussi bien myéloïdes que lymphoïdes sont capables de générer les cellules précurseurs des DC (Watowich and Liu, 2010). Elles sont essentielles à l'orchestration des réponses immunes innée et adaptative. À l'état basal, elles sont immatures (iDC), migrent en réponse à des signaux inflammatoires et possèdent une forte capacité d'endocytose, de macropinocytose et de phagocytose. Les iDC sont stratégiquement localisées au niveau des barrières muqueuses et dans les tissus conjonctifs de la plupart des organes, où elles jouent le rôle de sentinelles du système immunitaire. Les iDC détectent puis capturent les antigènes présents dans le milieu extracellulaire. Ces derniers se présentent souvent sous forme de corps apoptotiques provenant de cellules endommagées par les effecteurs de la réponse innée ou par les facteurs de stress du microenvironnement dans lequel elles baignent. Ces signaux de danger endogènes ou DAMP (*Damage-Associated Molecular Patterns*) peuvent être détectés notamment par les TLR (Marshak-Rothstein, 2006; Marshak-Rothstein and Rifkin, 2007). Suite à l'internalisation des antigènes, les DC engagent un processus de maturation et acquièrent des caractéristiques de cellules présentatrices professionnelles (CPA). Elles perdent alors leur pouvoir migratoire ainsi que leur capacité de phagocytose et rejoignent le ganglion drainant grâce aux récepteurs aux chémokines qu'elles expriment (CCR7, CXCR4, CCR4) (Ueno *et al.*, 2007). Les DC matures présentent les molécules de costimulation CD80/CD86 à leur surface et produisent également de nombreuses cytokines comme l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et le TNF- $\alpha$  permettant de stimuler la réponse immunitaire. Pour induire une réponse immune adaptative, les peptides antigéniques, issus de la dégradation intracellulaire des protéines internalisées, sont alors classiquement présentés sous forme de complexes CMH-II/peptide ou CMH-I/peptide et reconnus spécifiquement par les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> respectivement. De plus, grâce à leur capacité à présenter de manière croisée (cross-priming) les peptides antigéniques, les DC activent efficacement les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques (Spiotto et al., 2002).

### 1.2. Les effecteurs de la réponse adaptative

Contrairement aux cellules de la réponse innée, les lymphocytes T et B du système adaptatif expriment des récepteurs spécifiques d'antigène hautement hétérogènes. Les récepteurs des cellules T (TCR pour *T-Cell Receptor*) et les récepteurs des cellules B (BCR pour *B-Cell Receptor*) sont générés par un réarrangement arbitraire de segments de gènes codant respectivement les TCR (chaînes TCR $\alpha$  et TCR $\beta$ ) et les immunoglobulines (Ig), produisant par conséquent des répertoires T et B extrêmement variés. Cette diversité se traduit par un vaste potentiel de réponses spécifiques (Goldrath and Bevan, 1999). L'immunité adaptative s'établit de manière plus lente que l'immunité innée mais induit une lyse beaucoup plus spécifique. Elle peut également induire la différenciation d'une catégorie lymphocytaire à longue durée de vie, dite « mémoire », capable de maintenir un haut niveau de réactivité vis-à-vis du même antigène pouvant menacer l'organisme ultérieurement ; expliquant la durabilité de ce type de réponse immunologique. Ces cellules dérivent d'un progéniteur lymphoïde commun et les organes lymphoïdes primaires sont le siège de leur ontogénie. Les LB arrivent à maturité presque exclusivement dans la moelle osseuse avec deux devenir possibles : une différenciation terminale en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Ac) qui visent à faciliter la phagocytose après opsonisation de l'antigène, ou une polarisation en LB mémoires présentant des Ac membranaires spécifiques permettant une réponse plus rapide si une seconde infection se présente (Pieper *et al.*, 2013). Ils sont donc responsables de l'immunité adaptative humorale. En revanche, les LT mûrissent au stade de thymocytes simple positif CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> dans le thymus avant d'être déployés dans les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques (rate, ganglions lymphatiques, amygdales, plaques de Peyer) pour y achever leur différenciation après rencontre avec un antigène spécifique (Drayton *et al.*, 2006; Starr *et al.*, 2003). Ils orchestrent alors les réponses immunes à médiation cellulaire.

### 1.3. Les populations lymphocytaires T non conventionnelles

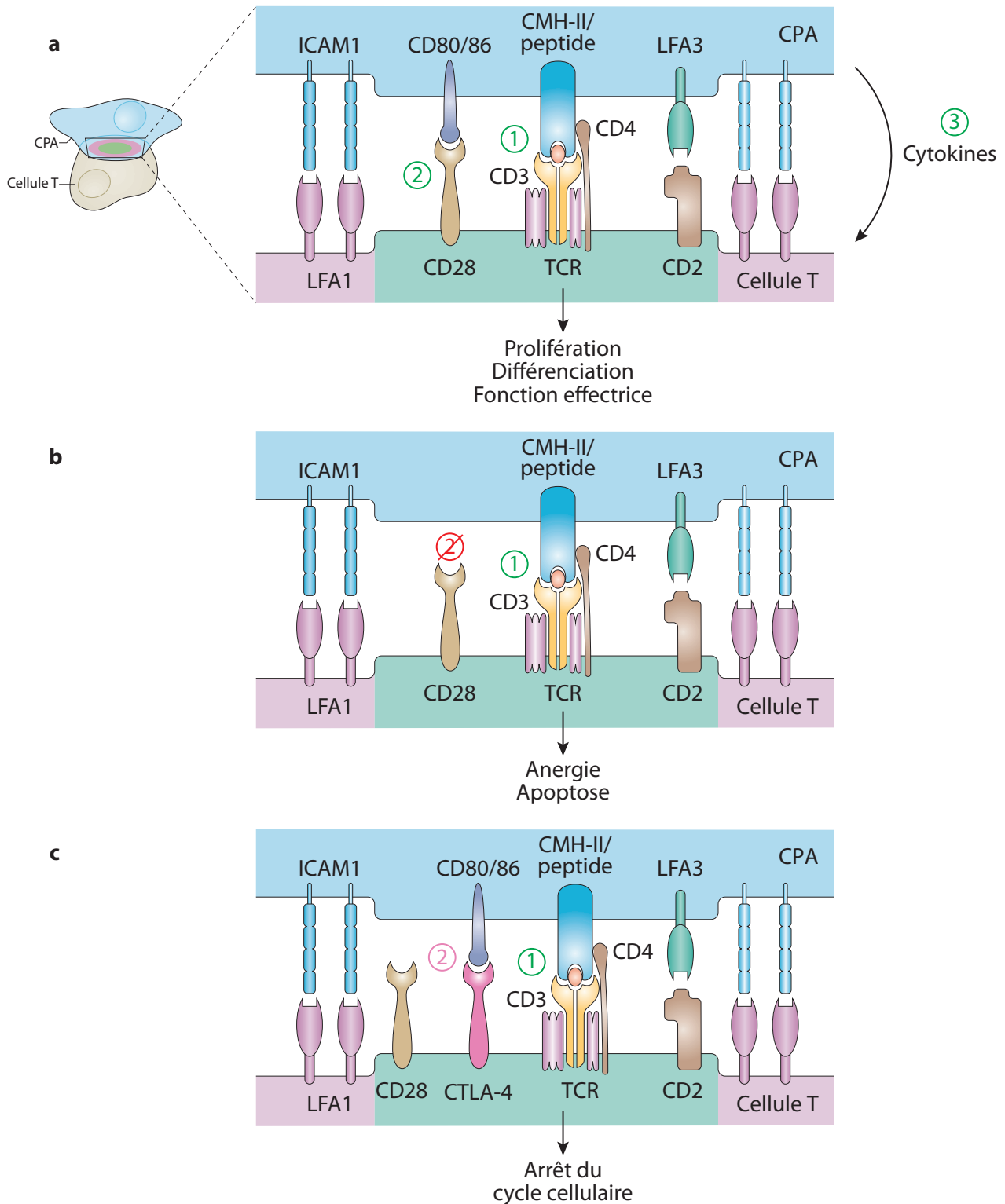
Il existe enfin deux types de lymphocytes T supplémentaires dont les fonctions sont à la frontière des réponses innée et adaptative : les lymphocytes T $\gamma\delta$  exprimant un TCR-1 (réarrangement des chaînes  $\gamma\delta$ ) et les cellules T Natural Killer (NKT) présentant un TCR-2 quasi invariant (TCR $\alpha\beta$  restreint à la reconnaissance de lipides et glycolipides présentés par la molécule CD1d). A l'image des lymphocytes T conventionnels, ces populations dérivent

d'un progéniteur lymphoïde, présentent un TCR associé à un CD3 mais ne présentent ni CD4, ni CD8. Elles rejoignent les cellules de l'immunité innée en ce sens que la diversité combinatoire de leurs TCR est relativement restreinte, s'apparentant ainsi à des PRR capables de répondre rapidement à des antigènes peptidiques ou non. Le rôle de ces populations cellulaires dans l'immunité antitumorale est équivoque. En effet, parmi les cellules NKT on dénombre au moins deux sous-populations : les NKT de type I (ou iNKT) et ceux de type II. Tandis que les NKT de type II favoriseraient la croissance tumorale *via* la production d'IL-13 et la stimulation de MDSC (Terabe *et al.*, 2005), les iNKT contribueraient au rejet de la tumeur (Taniguchi *et al.*, 2010). Enfin, la cytotoxicité directe des LT $\gamma\delta$  (Bonneville and Scotet, 2006) ou leur capacité à stimuler l'activité cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales (Maniar *et al.*, 2010) ainsi que la sécrétion de chémokines capables de mobiliser des LT activés, DC et granulocytes (Boismenu *et al.*, 1996) classent ces cellules au rang d'effecteurs antitumoraux. Néanmoins, un nombre croissant d'études menées chez la souris montre que les LT $\gamma\delta$  peuvent présenter des fonctions immuno-régulatrices par la lyse des macrophages activés (Dalton *et al.*, 2004), la sécrétion de TGF- $\beta$  et d'IL-10 (Ashour and Niederkorn, 2006; Bhagat *et al.*, 2008; Kapp *et al.*, 2004) ou l'induction de l'apoptose des cellules T CD4 et CD8 activées (Bhagat *et al.*, 2008; Vincent *et al.*, 1996).

*Dans la suite de cette section du manuscrit, nous discuterons exclusivement des lymphocytes T CD4, cellules d'intérêt dans la pathologie cancéreuse à laquelle mes travaux ont été consacrés.*

**Tableau 3. Représentation schématique et classification des PRR et de leurs ligands.**

PRR	Structure	Localisation	Ligand	Source ligand
<b>TLR</b> → sensing des PAMP et DAMP				
TLR1		Membrane plasmique	Lipoprotéine triacylée	Bactéries
TLR2		Membrane plasmique	Lipoprotéine, HSP	Bactériens, virus, parasites, soi
TLR3		Endolysosome	ARN double brin	Virus
TLR4		Membrane plasmique	LPS, HSP, HMGB1, fibronectine, fibrinogène	Bactéries, virus, soi
TLR5		Membrane plasmique	Flagelline	Bactéries
TLR6		Membrane plasmique	Lipoprotéine diacylée	Bactéries, virus
TLR7 (TLR8 humain)		Endolysosome	ARN simple brin	Virus, bactéries, soi
TLR9	Endolysosome	ADN CpG non méthylé	Virus, bactéries, protozoaires, soi	
TLR10	Endolysosome	Inconnu	Inconnu	
TLR11	Membrane plasmique	Molécule Profilin-like	Protozoaires	
<b>RLR</b> Cytoplasme → sensing des PAMP				
RIG-I			Court ARNdb, ARNdb 5'triphosphate	Virus à ARN ou à ADN
MDA5			Long ARNdb	Virus à ARN
LGP2			Inconnu	Virus à ARN
<b>NLR</b> Cytoplasme → sensing des PAMP et DAMP				
NLRP			MDP, ATP, cristaux d'acide urique	Bactéries, virus, soi
NOD1/2, NLRC			iE-DAP, MDP	Bactéries
NAIP			Flagelline	Bactéries
DAI			ADN	Virus
AIM2			ADN	Virus
<b>CLR</b> Membrane plasmique → sensing des PAMP et DAMP				
Dectine-1		β-glucane	Champignons	
Dectine-2		β-glucane	Champignons	
MINCLE		SAP130	Soi, champignons	



**Figure 6. La synapse immunologique et les signaux moléculaires engageant l'activation des cellules T CD4.**  
**a)** La synapse immunologique constitue une zone de contacts privilégiés entre la cellule présentatrice d'antigène (CPA) et le lymphocyte T CD4. L'interaction du TCR associé à CD3 avec le complexe CMH-II/peptide fournit le premier signal d'activation (1). Il module l'expression de molécules d'adhésion favorisant le contact cellule-cellule (CD2, LFA1/3 et ICAM). Le deuxième signal, dit de costimulation, est médié par la liaison de CD28 à CD80/86 (2). Il soutient l'activation et la prolifération lymphocytaire. La production de cytokines délivre le troisième signal (3). Il oriente la différenciation lymphocytaire et permet l'expansion clonale. **b)** L'absence de signal de costimulation interdit l'activation du lymphocyte et provoque son anergie ou son apoptose. **c)** L'interaction de molécules inhibitrices telles que CTLA-4 ou PD-1 avec leurs cibles (CD80/86 et PD-L1 respectivement) provoquent l'arrêt du cycle cellulaire. Adapté de (Friedl *et al.*, 2005).

## 2. La différenciation des cellules T CD4 naïves

Une cellule T CD4 naïve est une cellule T mature qui n'a pas encore rencontré d'antigène. Elle est caractérisée par l'expression des marqueurs CD62L (L-sélectine) et CCR7 (récepteur des chémokines constitutionnelles CCL19 et CCL21) ainsi que par l'absence d'expression des marqueurs de cellules effectrices CD44 et CD25. La présence de CD62L et de CCR7 gage de leur capacité de domiciliation itérative dans les organes lymphoïdes secondaires guidée par le *homing* des molécules CCL19 et CCL21 abondamment présentes dans ces structures. La différenciation en cellule T effectrice nécessite l'intervention de trois signaux.

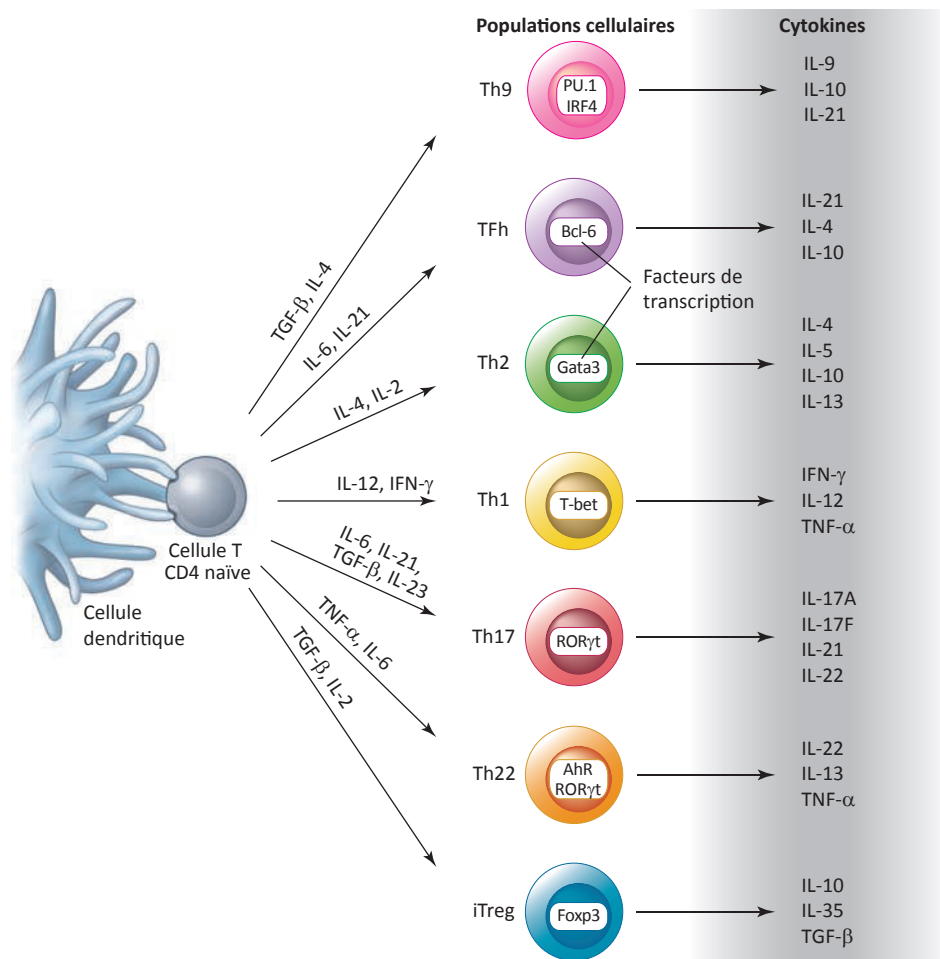
### 2.1. Les signaux moléculaires engageant la différenciation

La différenciation T CD4 est initiée par une interaction tri-moléculaire entre le TCR associé à son co-récepteur CD4 et le complexe CMH-II/peptide immunogène présenté par la cellule dendritique en tant que CPA professionnelle (Jenkins *et al.*, 2001). L'engagement du TCR fournit le premier signal d'activation de la cellule T CD4. L'intensité et la durée de ce premier signal vont être renforcées par l'intermédiaire d'autres molécules telles que les molécules d'adhésion CD2 et LFA-1 du côté lymphocytaire ou LFA3 et ICAM1 au niveau de la CPA. C'est alors que s'opère une réorganisation du cytosquelette qui engendre la formation d'une zone de contact privilégiée : la synapse immunologique (Dustin and Cooper, 2000) (*Figure 6*, p. 49). Il s'agit d'une structure dynamique favorisant un contact étroit entre le LT et la CPA afin d'optimiser la signalisation initiale ainsi que l'inactivation tardive des complexes TCR/CMH-II.

Le second signal provient d'une interaction entre deux molécules costimulatrices : CD28, constitutivement exprimée par le lymphocyte T et CD80 ou CD86 à la surface des DC activées (Greenwald *et al.*, 2005). La liaison de CD28 à CD80/86 au moment de la reconnaissance antigénique permet l'activation et la prolifération clonale des lymphocytes T CD4. Ce signal de costimulation est indispensable pour prévenir les cellules T d'une anergie ou d'une apoptose précoce intervenant en son absence. Il induit par ailleurs l'expression de molécules annexes de costimulation (CD40, CD40L) dont l'interaction résulte en une boucle positive d'activation renforçant la signalisation par CD28 et la prolifération lymphocytaire consécutive. Pour parer à une prolifération incontrôlée, une régulation fine s'instaure et met en jeu l'expression de molécules inhibitrices. L'induction de CTLA-4 par le lymphocyte T (*Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4*) permet un rétrocontrôle négatif de la boucle

d'amplification précédemment décrite, et ce par compétition avec CD28 (Pentcheva-Hoang *et al.*, 2004). En effet, CTLA-4 est un homologue de CD28 bien plus affin pour les molécules CD80/86. La molécule PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*) interviendra plus tardivement afin d'inactiver les interactions cellulaires LT/CPA. Sa liaison avec PD-L1 (*Programmed cell Death 1 Ligand 1*) présent au niveau de la CPA conduira au blocage de la prolifération lymphocytaire et/ou à l'apoptose (Parry *et al.*, 2005; Tsushima *et al.*, 2007). Ces molécules coinhibitrices jouent par ailleurs un rôle non négligeable dans l'échappement tumoral. Des analyses phénotypiques ont révélé que les cellules T infiltrantes exprimaient plus fortement CTLA-4 par rapport aux cellules T circulantes. Dans le microenvironnement tumoral, l'interaction de CTLA-4 avec ses ligands induit et/ou soutient le phénotype régulateur des lymphocytes T (Lohr *et al.*, 2003; Loser *et al.*, 2005). De même, PD-L1 a été détecté par immunohistochimie dans la plupart des tumeurs humaines et associé à une plus forte agressivité de certaines d'entre elles (Azuma *et al.*, 2008; Ghebeh *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2004). Dans le cas du mélanome, les lymphocytes T infiltrant les lésions métastatiques sur-expriment PD-1 en comparaison aux lymphocytes T autologues du sang périphérique ou de tissu sain (Ahmadzadeh *et al.*, 2009; Mumprecht *et al.*, 2009). Bien que la liaison de PD-L1 à son récepteur PD-1 soit un des mécanismes connus d'échappement tumoral menant à l'inactivation et/ou à l'épuisement des lymphocytes T infiltrant la tumeur (Chen and Mellman, 2013), l'expression de PD-L1 ou de PD-1 n'est toutefois pas toujours associée à un mauvais pronostic. Des études rapportent qu'une surexpression de ces molécules reflète une issue favorable chez les patients atteints de cancers de l'oropharynx associés aux papillomavirus humains oncogéniques (Badoual *et al.*, 2013), de lymphome folliculaire (Carreras *et al.*, 2009) ou de mélanome (Taube *et al.*, 2012). Ainsi, l'expression de PD-1 dans une tumeur ne signe pas nécessairement la présence de LT épuisés, mais peut aussi correspondre à un marqueur d'activation des LT, reflétant alors une réponse antitumorale à l'origine du phénotype d'activation lymphocytaire. En somme, la présence d'une même molécule (PD-1 ou PD-L1) peut avoir des significations distinctes et être associée à un pronostic différent suivant le contexte tumoral et les mécanismes responsables de leur régulation.

Enfin, la présence de cytokines dans le milieu est requise et constitue le troisième signal de différenciation des cellules T CD4 activées (Zhou *et al.*, 2009). En réponse aux signaux délivrés par le TCR et CD28, les DC activées sécrètent des cytokines qui vont agir de façon



**Figure 7. La différenciation des lymphocytes T CD4.**

Après stimulation antigénique, l'engagement du TCR associé à la costimulation médiée par CD28 concourt à l'activation et à la prolifération d'un lymphocyte T CD4. L'orientation de la différenciation cellulaire T CD4 est alors fonction de l'environnement cytokinique façonné/modulé par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. La spécialisation fonctionnelle des lymphocytes T CD4 est finalement coordonnée par un programme génétique, lui-même placé sous le contrôle de facteurs de transcription spécifiques. D'après (O'Shea and Paul, 2010).



paracrine sur le lymphocyte T naïf et orienter sa différenciation en sous-types lymphocytaires distincts. Ces signaux, l'IL-2 tout particulièrement, autorisent la progression du cycle cellulaire ainsi que l'activation du métabolisme nécessaire à la multiplication clonale. La capacité des cellules dendritiques à induire la différenciation des cellules T naïves en cellules T effectrices dépend donc de la nature des cytokines qu'elles produisent (*Figure 7*, p. 52). Il est désormais admis que la serine/thréonine kinase mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) intègre l'ensemble des signaux en provenance des molécules costimulatrices et coinhibitrices et des récepteurs aux cytokines (Chi, 2012). Cette kinase joue le rôle de régulateur central du métabolisme et de la survie cellulaire en réponse aux facteurs environnementaux. Elle est présente sous la forme de deux complexes de signalisation, mTORC1 et mTORC2. Plus particulièrement, l'activation de la voie Akt/mTORC1 est nécessaire à la stimulation de la glycolyse et à l'augmentation de l'expression des récepteurs aux nutriments au sein du lymphocyte T. Cette activation permet de répondre aux exigences du programme de prolifération lymphocytaire en termes de dépenses métaboliques et énergétiques. mTOR a donc été récemment proposée comme un rhéostat de l'activation lymphocytaire (Powell and Delgoffe, 2010).<sup>2</sup>

## 2.2. L'hétérogénéité cellulaire T CD4 : génération de sous-types effecteurs et régulateurs

Les cellules T effectrices, issues d'une différenciation terminale de précurseurs T CD4<sup>+</sup> naïfs en réponse à une stimulation antigénique spécifique, ont longtemps été conceptuellement représentées par deux sous-populations : Th1 et Th2 (Mosmann *et al.*, 1986). Elles revêtent en réalité une vaste hétérogénéité fonctionnelle avec des profils de sécrétion cytokinique bien définis et des programmes géniques de mieux en mieux compris. Elles sont d'ailleurs souvent nommées d'après la signature de leur profil cytokinique. On distingue aujourd'hui six types de polarisation auxiliaire (ou *helper*) effectrice (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 et TFh) et quatre sous-types cellulaires immunosuppresseurs (iTreg, Tr1, Th3 et iT35). La diversité de ces cellules T effectrices permet d'adapter la réponse immunitaire selon la nature du pathogène/signal de danger détecté. Ainsi, la réponse T CD4 effectrice va impliquer de façon différentielle un sous-ensemble cellulaire lors d'une réponse antivirale, contre un parasite

---

<sup>2</sup> Les inhibiteurs de mTOR font l'objet d'un récent intérêt en cancérologie du fait de leur action antiproliférative sur les cellules tumorales. Ces effets antitumoraux directs devront être mis en balance avec le risque associé à l'inhibition de la réponse T antitumorale.

extracellulaire ou vis-à-vis des cellules cancéreuses. Une plasticité et une régulation très fine de la réponse immune permet d'amplifier ou au contraire d'inhiber ces sous-populations lymphocytaires, à la faveur du contexte immunitaire.

### 3. Les cellules Th1

#### 3.1. Caractérisation et spécialisation fonctionnelle

Les lymphocytes Th1 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-bet (*T-box transcription factor*) et leur capacité à sécréter principalement l'IFN- $\gamma$ , la lymphotoxine  $\alpha$  (LT $\alpha$ ), l'IL-2 et les TNF- $\alpha/\beta$  en moindre mesure. Ils expriment les récepteurs aux chémokines CCR5 et CXCR3. Les Th1 orchestrent les réponses immunes à médiation cellulaire dirigées contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus, les bactéries ou les antigènes tumoraux (Del Prete, 1992; Mosmann and Coffman, 1989; Paul and Seder, 1994). Ils exercent leurs effets de façon indirecte, à travers les cytokines qu'ils sécrètent. Les Th1 activent les cellules NK, stimulent la maturation des cellules dendritiques (Pan *et al.*, 2004) et soutiennent les fonctions phagocytaires et bactéricides des macrophages (Suzuki *et al.*, 1988). Ils sont également impliqués dans la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques (Schroder *et al.*, 2004) et l'acquisition par ces cellules d'un phénotype mémoire (Bourgeois *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2003). Les Th1 jouent donc un rôle primordial dans l'aide qu'ils apportent aux cellules T CD8. Cependant, les réponses Th1 peuvent être à l'origine de lésions immuno-pathologiques tissulaires, notamment en présence d'une infection chronique. Ce sous-type lymphocytaire est en effet associé à de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que la sclérose en plaque, le diabète insulino-dépendant et la polyarthrite rhumatoïde (Chen and Liu, 2009). De même lors d'une greffe, une réponse Th1 non maîtrisée du receveur à l'égard du greffon constitue un obstacle majeur au succès de la transplantation.

#### 3.2. La régulation transcriptionnelle

L'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  initient la différenciation des cellules Th1 (Trinchieri *et al.*, 2003). Suite à la stimulation de leurs PRR, les CPA activées sécrètent de l'IL-12 en grande quantité (Trinchieri and Sher, 2007). L'IL-12 présente dans le milieu induit en retour la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK. Cet IFN- $\gamma$  extracellulaire stimule son récepteur (IFN- $\gamma$ R) qui induit l'activation de STAT1 dans le cytoplasme du lymphocyte. STAT1 activée est capable de jouer son rôle de

facteur de transcription dans le noyau, elle est responsable de l'expression de T-bet qui lui induit la transcription d'IFN- $\gamma$  et celle du récepteur de l'IL-12 (IL-12R) (Lighvani *et al.*, 2001). Parallèlement, l'IL-12 se lie à son récepteur et provoque la phosphorylation de STAT4 qui transloque dans le noyau pour aller transactiver le gène codant l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  produit par les cellules Th1 agit alors de manière autocrine pour soutenir leur différenciation grâce à cette boucle de rétrocontrôle positif. L'induction de T-bet est donc non seulement responsable de l'activation des gènes clés de la différenciation Th1 (Afkarian *et al.*, 2002) mais aussi de la répression d'autres sous-types comme les cellules Th2 et Th17 (Lazarevic *et al.*, 2011; Lugo-Villarino *et al.*, 2003). En effet, T-bet réprime la transcription du gène codant l'IL-4 (Djuretic *et al.*, 2007) et inhibe GATA3 (*GATA-binding protein 3*), le facteur de transcription central des lymphocytes Th2 (Hwang *et al.*, 2005). De même, T-bet bloque la transcription du gène *Rorc* qui code pour le principal facteur de transcription des Th17, ROR $\gamma$ t (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor gamma-t*) (Lazarevic *et al.*, 2011). D'autres protéines coopèrent avec T-bet soit pour promouvoir la différenciation cellulaire Th1 à l'instar de Runx3 (*Runt-related transcription factor 3*) (Djuretic *et al.*, 2007), soit pour l'inhiber dans le cas de Eomes (*Eomesdermine*) (Fujio *et al.*, 2010). Enfin, il a été récemment décrit que T-bet jouait un rôle de répresseur transcriptionnel (Oestreich *et al.*, 2011). Il interagit directement au niveau des régions promotrices des gènes codant *Socs1* et *Socs3* (*Suppressor of cytokine signalling*) pour les inhiber et ainsi accroître la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules Th1. En effet, les protéines SOCS sont des facteurs cruciaux de la régulation négative des membres de la famille des STAT. A un stade avancé de la polarisation Th1, T-bet recrute le répresseur transcriptionnel Bcl-6 (*B-Cell Lymphoma 6*) avec qui il s'associe pour réguler négativement l'activité du locus *Ifng*. Ce mécanisme est présent pour limiter une surproduction d'IFN- $\gamma$  et ainsi prévenir des désordres de type auto-immun.

### 3.3. Rôle prédominant des cellules Th1 dans l'immunité antitumorale

Les cellules Th1 ont été formellement impliquées dans la protection antitumorale. Nous avons précédemment évoqué le fait d'une susceptibilité accrue à l'incidence de tumeurs chez les animaux présentant des réponses Th1 réduites, à savoir déficients pour l'IFN- $\gamma$  ou son récepteur, pour l'IL-12 ou encore pour STAT1 (Shankaran *et al.*, 2001) (*cf. Tableau 2, p. 30*). Ces données suggèrent donc l'implication de la réponse Th1 dans l'immunité antitumorale. Le rôle pronostique de l'IFN- $\gamma$  et d'une réponse Th1 a d'ailleurs été montré

dans les cancers du col de l'utérus (Tartour *et al.*, 1998). De plus, la restauration de l'expression de T-bet chez des souris invalidées pour ce gène inhibe le développement de métastases pulmonaires de mélanome (Lee *et al.*, 2010), ce qui confirme le rôle crucial des réponses de type Th1 dans un contexte de cancer. Par ailleurs, outre leurs fonctions auxiliaires, il a été rapporté qu'après une forte activation par l'antigène, les cellules Th1 étaient capables de fonctions effectrices cytotoxiques directes à l'encontre des cellules cancéreuses *via* la production consécutive d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et de granules cytotoxiques contenant perforine et granzymes (DeNardo *et al.*, 2010). Des travaux récents soulignent une participation originale des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à la réponse antitumorale : dans un modèle de lymphome agressif induit par l'oncogène *myc*, les cellules T CD4<sup>+</sup> participent à la régression tumorale associée à l'inactivation de *myc* en remodelant le microenvironnement tumoral, notamment *via* la sécrétion de thrombospondine, un inhibiteur de l'angiogenèse (Rakhra *et al.*, 2010). Chez l'Homme, le rôle majeur de la réponse Th1 dans le contrôle du cancer a également été confirmé ((Fridman *et al.*, 2012) (Tableau 4, p. 65). Dans une étude permettant de déterminer l'influence de la qualité de la réponse immunitaire au site tumoral sur le pronostic de patients atteints de cancer du côlon, l'équipe de Jérôme Galon a en effet montré que l'expression d'un groupe de gènes associés à la réponse Th1 et T cytotoxique (comprenant notamment les gènes codant l'IFN- $\gamma$  et T-bet) était corrélée à un plus faible taux de rechute (Galon *et al.*, 2006). De même, dans les carcinomes gastriques un fort ratio Th1/Th2 est corrélé à un bon pronostic et associé à un meilleur taux de survie à 5 ans (Ubukata *et al.*, 2010).

## 4. Les cellules Th2

### 4.1. Caractérisation et spécialisation fonctionnelle

Les cellules Th2 sont définies par l'expression du facteur de transcription GATA3 et la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 essentiellement, mais aussi d'IL-9, d'IL-10 et d'IL-25 en moindre importance (Luckheeram *et al.*, 2012; Zheng and Flavell, 1997). D'un point de vue phénotypique, elles présentent à leur surface la molécule CCR4 et le récepteur de la prostaglandine D2 (CD294). Ces cellules orientent une réponse humorale dirigée contre les pathogènes extracellulaires (parasites, bactéries, toxines) et ce par coopération avec les lymphocytes B sécréteurs d'anticorps ou des effecteurs cellulaires de l'immunité innée. L'IL-4 et l'IL-5 sont particulièrement importantes pour la production d'immunoglobulines E

(IgE) par les lymphocytes B (Li *et al.*, 2011). La liaison d'IgE sur le fragment Fc de leur récepteur présent à la surface des mastocytes et des polynucléaires basophiles conduit à leur activation, à une dégranulation puis à la libération de puissants médiateurs (histamine, sérotonine) par ces cellules phagocytaires (Steinke and Borish, 2001). Les Th2 jouent ainsi un rôle majeur dans l'induction et la persistance de l'asthme et d'autres pathologies allergiques (Del Prete, 1992; Sokol *et al.*, 2009). L'IL-5 et l'IL-9 favorisent le recrutement des polynucléaires éosinophiles et des mastocytes, respectivement (Li *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'IL-13 est la cytokine responsable de l'expulsion des helminthes et de l'hypersensibilité des voies aériennes liée à la pathologie asthmatique (Wynn, 2003). L'IL-4 et l'IL-13 peuvent également exercer des effets pro-athérogènes et soutenir le développement de plaque d'athérome. Enfin, le rôle des cellules Th2 a aussi été démontré dans la réaction du greffon contre l'hôte (GVH : *Graft Versus Host*) chronique.

#### 4.2. La régulation transcriptionnelle

L'exposition des cellules T CD4 naïves à l'IL-4 et à l'IL-2 leur permet d'acquérir les fonctions effectrices de type Th2. L'IL-4 initie une cascade de signalisation menant à la phosphorylation de STAT6 *via* la voie JAK/STAT (Kaplan *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2001). STAT6 phosphorylée est ensuite responsable de la transcription du gène codant GATA3, le régulateur central de la différenciation Th2 (Zhu *et al.*, 2006b). De plus, STAT6 s'associe à IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) pour interagir au niveau des régions promotrices du gène *il4* et induire sa transcription. La transcription d'*il4* est par ailleurs amplifiée après liaison du complexe protéique IRF4/NFATc2 (*Nuclear Factor of Activated T cell 2*) à des sites spécifiques situés dans le promoteur de ce gène (Rengarajan *et al.*, 2002). L'expression de GATA3 est véritablement requise pour la différenciation Th2 puisque son absence mène à l'arrêt de la différenciation (Pai *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004). L'activité transcriptionnelle de GATA3 est responsable de la production d'IL-5 et d'IL-13 et renforce celle de l'IL-4. Il a aussi été décrit que GATA3 recrutait Gfi-1 (*Growth factor independent-1*), un répresseur transcriptionnel précocement et transitoirement induit suite à la signalisation IL-4/STAT6 et à la stimulation du TCR. Gfi-1 favorise la prolifération sélective des cellules sur-exprimant GATA3 (Zhu *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006a). GATA3 est également impliqué dans la répression de la différenciation Th1. Il réprime l'expression de STAT4 et la transcription consécutive d'*Ifng*, bloquant ainsi le profil Th1 (Usui *et al.*, 2003). De la même

manière, l'IL-2 active STAT5 par phosphorylation *via* la voie JAK/STAT (Cote-Sierra *et al.*, 2004). Cette forte activation de STAT5, indépendante de l'IL-4, ne conduit pas à l'expression de GATA3 mais reste essentielle à la différenciation cellulaire Th2 car elle soutient la prolifération et la survie de ces cellules. Le complexe STAT5/GATA3 interagit sur le second intron du locus *Il4* pour activer sa transcription (Zhu *et al.*, 2003). Des travaux récents dans l'équipe suggèrent l'implication de la protéine NLRP3 (*NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3*). Son activité transcriptionnelle soutiendrait la transcription du gène codant l'IL-4 après interaction de NLRP3 et d'IRF4 sur ce locus.

#### 4.3. Activité protumorale des cellules Th2

Les lymphocytes Th2 sont susceptibles de promouvoir la survie et la prolifération des cellules tumorales par l'intermédiaire des cytokines qu'ils sécrètent. Ils favorisent notamment la polarisation de macrophages intratumoraux de type M2 *via* la production d'IL-10 et/ou d'IL-4 (Aspord *et al.*, 2007; DeNardo *et al.*, 2009). La littérature énonce que les macrophages présents au sein de la tumeur sont principalement de phénotype M2 et donc protumoraux en raison des cytokines qui imprègnent l'environnement de la tumeur (Mantovani *et al.*, 2008). De fait, la densité de l'infiltrat macrophagique est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers (Fridman *et al.*, 2012; Lewis and Pollard, 2006) (*Tableau 4*, p. 65). L'IL-4 agit aussi de façon délétère sur les cellules T CD8 en diminuant leur activité cytotoxique antitumorale (Olver *et al.*, 2013). En outre, de nombreux types histologiques de tumeurs expriment le récepteur de l'IL-4 et peuvent ainsi répondre à cette cytokine. L'IL-4 exerce une action protumorale directe en conférant aux cellules cancéreuses une résistance accrue à l'apoptose (Li *et al.*, 2008).

### 5. Les cellules Th17

#### 5.1. Caractérisation et spécialisation fonctionnelle

Le paradigme Th1/Th2 introduit il y a près de trente ans (Mosmann *et al.*, 1986) a été élargi après la découverte d'une nouvelle population lymphocytaire, les cellules Th17 (Harrington *et al.*, 2005). Leurs propriétés inflammatoires marquées, autrefois attribuées à des réponses Th1, proviennent de leur capacité à sécréter l'IL-17A, une cytokine fortement pro-inflammatoire. Ces cellules sont également caractérisées par la libération d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22 et la co-expression des marqueurs membranaires CCR6 et CCR4. Leur

différenciation est placée sous le contrôle du facteur de transcription ROR $\gamma$ t (Ivanov *et al.*, 2006). Les études réalisées sur les Th17 ont montré leur implication dans les défenses anti-infectieuses vis-à-vis des bactéries extracellulaires et de champignons (Puel *et al.*, 2011; Weaver *et al.*, 2007). Ils contribuent notamment au recrutement et à l'activation des neutrophiles au niveau des sites infectieux. La fonction de clairance de certains pathogènes par les cellules Th17 nécessite une réponse inflammatoire massive. L'IL-22 participe à cette réponse inflammatoire et renforce ainsi les défenses de l'hôte contre les bactéries pathogènes (Aujla *et al.*, 2008). L'IL-21 exerce des effets pléiotropes : elle active les cellules NK et les lymphocytes T et soutient la différenciation des lymphocytes B en cellules effectrices et mémoires (Korn *et al.*, 2007; Leonard and Spolski, 2005). Les Th17 sont aussi les effecteurs principaux de pathologies dysimmunitaires telles que le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et sont également impliqués dans l'immunosuppression tumorale (Muranski and Restifo, 2013; Weaver *et al.*, 2006). L'IL-17 induit la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  et promeut l'angiogenèse *via* le VEGF. L'IL-17 est donc en grande partie responsable de l'immunosuppression exercée par les Th17.

### 5.2. La régulation transcriptionnelle

Le modèle actuel sur lequel repose la génération des Th17 permet d'établir les rôles cruciaux joués par diverses cytokines, définissant trois étapes dans ce processus de différenciation : i) l'initiation, ii) l'auto-amplification et iii) la stabilisation. La présence concomitante d'IL-6 et de TGF- $\beta$  semble indispensable à l'initiation de la différenciation de ces cellules (Veldhoen *et al.*, 2006). Le signal inflammatoire émis par l'IL-6 induit alors une sécrétion autocrine d'IL-21 par le lymphocyte T engagé dans la polarisation Th17 qui lui permet d'entretenir son amplification. L'IL-21 produite favorise notamment l'expression du récepteur de l'IL-23 et de ROR $\gamma$ t, le facteur de transcription le plus spécifique des cellules Th17 (Ivanov *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Ainsi, l'IL-23 sécrétée par les CPA pourra jouer son rôle dans le maintien et l'expansion de la lignée cellulaire Th17 (Langrish *et al.*, 2005). En outre, ROR $\gamma$ t, *via* un autre facteur de régulation transcriptionnelle, STAT3, stimulera la synthèse d'IL-17A et F (Yang *et al.*, 2007). L'expression de STAT3 dans ces cellules établit alors clairement la nécessité des deux signaux pour déclencher la différenciation Th17. La signalisation médiée par les interleukines 6, 21 (et 23) active non seulement STAT3 mais induit aussi l'expression

de l'un de ses principaux répresseurs, SOCS3. Le signal émis par le TGF- $\beta$  inhibe SOCS3 interdisant ainsi la répression qui pourrait survenir sur la voie STAT3 (Chen *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2009). Des mécanismes moléculaires faisant intervenir d'autres facteurs transcriptionnels sous-tendent également la polarisation Th17. Ainsi, la coopération entre ROR $\alpha$  et ROR $\gamma$ t agit de façon synergique sur la différenciation Th17 (Yang *et al.*, 2008). De même, Runx1, AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) ou encore BATF (*Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*) participent au développement des cellules effectrices Th17 (Luckheeram *et al.*, 2012).

### 5.3. Rôle controversé des cellules Th17 dans l'immunité antitumorale

L'exploration du rôle tenu par les cellules Th17 dans la progression tumorale a permis d'établir leur implication dans l'immunomodulation du cancer tout en soulignant leurs effets ambivalents (Fridman *et al.*, 2012; Végran *et al.*, 2013a) (*Tableau 4*, p. 65). Cette question reste encore actuellement débattue au vu des résultats contradictoires observés, probablement liés au type de tumeur étudié et à son environnement direct.

D'une part, les cellules Th17 ont été décrites pour favoriser l'immunosuppression tumorale. Il a été démontré qu'au sein de la tumeur, ces cellules étaient fonctionnelles et donc sécrétrices d'IL-17 conséquemment à l'activation de ROR $\gamma$ t. L'IL-17 stimule la production de facteurs angiogéniques comme le VEGF par les cellules stromales et les fibroblastes qui favorisent alors la construction d'un réseau vasculaire alimentant la tumeur (Berger *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2013). Elle soutient la néoangiogenèse et permet l'expression des gènes de survie par les cellules cancéreuses (Du *et al.*, 2012). Un infiltrat tumoral riche en Th17 a ainsi été corrélé positivement à la densité de microvaisseaux tumoraux (Numasaki *et al.*, 2003). L'IL-17 promeut également la lymphangiogenèse favorisant l'invasion métastatique des ganglions lymphatiques. *In vivo*, l'IL-17 permet le recrutement de macrophages au site tumoral ; ces cellules constituent une source d'IL-6 capable d'activer la voie oncogène STAT3 autorisant ainsi la progression tumorale (Fossiez *et al.*, 1996). Alors, la transplantation de cellules issues de lignées humaines de carcinome cervical sur-exprimant l'IL-17 à des souris *Nude* donne lieu au développement d'une tumeur, suggérant donc que l'IL-17 augmente l'immunogénicité des tumeurs (Tartour *et al.*, 1999). Cette cytokine soutient également la carcinogenèse *de novo* dans le modèle de carcinogenèse induite par DMBA/TPA (Wang *et*



*al.*, 2010). L'exposition prolongée à de faibles doses d'IL-1 $\beta$ , semblables à celles retrouvées en cas d'inflammation chronique, amplifie par ailleurs la production d'IL-17 par les cellules T CD4 (Bruchard *et al.*, 2013). L'action pro-inflammatoire et pro-angiogénique de l'IL-17 contribue donc au développement de cancers (Wang *et al.*, 2009) et joue pour beaucoup dans les fonctions immunosuppressives des Th17. Cependant, d'autres mécanismes protumoraux ont été rapportés. L'IL-22 promeut la tumorigenèse dans le cancer du côlon (Jiang *et al.*, 2013; Kryczek *et al.*, 2014). Dans un modèle expérimental de colite associée à une carcinose colique, l'absence du récepteur soluble de l'IL-22 (*IL-22 Binding Protein*) empêche sa neutralisation : une inflammation persistante en résulte et contribue au développement tumoral (Huber *et al.*, 2012). L'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 par les Th17 permet de convertir l'ATP et l'ADP relargués par les cellules endommagées ou mourantes en adénosine, molécule à fort potentiel immunosuppresseur (Chalmin *et al.*, 2012). Cette action suppressive est dirigée contre les cellules T effectrices CD4 et CD8 et dépend à la fois de l'activation de STAT3 par l'IL-6 et de l'inhibition de Gfi-1 par le TGF- $\beta$ .

D'autre part, de nombreuses études menées chez l'Homme et la souris suggèrent un rôle antitumoral des cellules Th17 et alimentent la controverse. Chez des patients atteints de cancer de la prostate, l'infiltration des cellules Th17 est inversement corrélée au stade clinique de la maladie (Sfanos *et al.*, 2008). De même, chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire, la présence de Th17 intratumoraux est fortement associée à un infiltrat cellulaire de type Th1, CD8<sup>+</sup> et NK et donc à une issue clinique favorable (Kryczek *et al.*, 2009a). En effet, l'IL-21 sécrétée par les Th17 active les fonctions antitumorales des cellules NK et des T cytotoxiques et induit notamment la production d'IFN- $\gamma$  expliquant la mobilisation des lymphocytes Th1 au lit tumoral (Nunez *et al.*, 2013). L'expression forcée d'IL-17 par certaines cellules tumorales (tumeurs hématopoïétiques, fibrosarcome) peut supprimer la tumorigenèse, la croissance tumorale et la dispersion de métastases (Benchetrit *et al.*, 2002; Kryczek *et al.*, 2009b; Tong *et al.*, 2012). Le transfert adoptif de cellules Th17 spécifiques de la tumeur dans des modèles murins a également démontré leur puissante activité anticancéreuse (Muranski *et al.*, 2008; Muranski *et al.*, 2011), notamment *via* leur capacité à se différencier en cellules productrices d'IFN- $\gamma$  (Martin-Orozco *et al.*, 2009). La littérature laisse donc à penser que deux phénotypes Th17 existent selon le contexte cytokinique : i) les cellules *Th17/Treg-like* immunosuppressives générées en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-6,

co-exprimant les ectonucléotidases CD39 et CD73 et définies comme  $ROR\gamma^{\text{hi}} \text{ Foxp3}^{\text{low}} \text{ IL-10}^+$   $\text{T-bet}^- \text{ IFN-}\gamma^-$  ainsi que ii) les cellules *Th17/Th1-like* inflammatoires et antitumorales générées en présence d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-23, caractérisées comme  $ROR\gamma^{\text{hi}} \text{ T-bet}^+ \text{ IFN-}\gamma^+$ . L'IL-10 produite par la première catégorie de cellules est immunosuppressive, elle abolit leur fonction pro-inflammatoire et réduit ainsi leur pathogénicité (McGeachy *et al.*, 2007). Ces phénotypes mixtes sont liés à la plasticité cellulaire inhérente aux cellules Th17 ; ce point sera abordé et discuté plus loin.

## 6. Les cellules Treg induites

### 6.1. Caractérisation et spécialisation fonctionnelle

Les iTreg (*inducible Treg*) sont des cellules T régulatrices immunosuppressives induites en périphérie (Baecher-Allan *et al.*, 2001). Elles se distinguent des nTreg ou Treg naturels dont la différenciation est achevée au sortir du thymus et qui expriment sélectivement la neuropiline 1 (Weiss *et al.*, 2012). Les iTreg sont caractérisées par l'expression de Foxp3 (*Forkhead box P3*), par la présence de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25) et de CCR4 à leur surface et par la production de cytokines suppressives que sont le TGF- $\beta$ , l'IL-10 et l'IL-35. Ces cellules sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie et de la tolérance immunitaire : suite à la clairance de pathogènes, ils restreignent les réponses immunitaires et préviennent ainsi l'apparition de troubles auto-immuns (Fujio *et al.*, 2010; Sakaguchi *et al.*, 2006). Comme vu précédemment, l'IL-10 supprime les réponses inflammatoires et inhibe l'activité des Th1, des NK et des macrophages ; elle limite ainsi les dommages tissulaires occasionnés lors d'une inflammation (Ouyang *et al.*, 2011). L'action synergique de l'IL-10 associée au TGF- $\beta$  atténue les réactions allergiques en supprimant la production d'IgE (Jutel and Akdis, 2008).

Parmi les cellules Treg induites on distingue les Th3, les Tr1 et plus récemment les iT35. Les cellules Th3 sont générées dans l'intestin et sont impliquées dans la tolérance orale. Elles produisent de grandes quantités de TGF- $\beta$ , de faibles quantités d'IL-10 et d'IL-4 mais ne sécrètent ni IFN- $\gamma$  ni IL-4 et de fait, sont capables de supprimer les réponses Th1 et Th2 (Weiner *et al.*, 2011). Les Tr1 sont caractérisés par une forte sécrétion d'IL-10, une production modeste d'IL-5 et plus faible encore d'IFN- $\gamma$ , de TGF- $\beta$  et d'IL-2 mais pas d'IL-4. Les quantités d'IL-10 sont telles qu'elles sont à l'origine du potentiel suppresseur des Tr1 sur

les autres populations T et provoque leur propre anergie (Groux, 2003). Les iT35 constituent une sous-population de cellules immunosuppressives. Ces pseudo-Treg n'expriment pas Foxp3, ne produisent ni TGF- $\beta$  ni IL-10 mais sécrètent l'IL-35 (Collison *et al.*, 2010; Collison *et al.*, 2012; Collison *et al.*, 2007).

## 6.2. La régulation transcriptionnelle

En présence de TGF- $\beta$  et d'IL-2 dans l'environnement cellulaire, les lymphocytes T CD4 naïfs seront destinés à se différencier en iTreg. La dualité du TGF- $\beta$  est mise en perspective puisque cette cytokine, en plus de participer à la polarisation Th17 ou Th9, promeut également le développement de ces cellules T régulatrices. Ses effets sont fonction de sa concentration. En réponse au TGF- $\beta$ , les iTreg expriment le facteur de transcription Foxp3 assurant à la fois le développement et la fonction immunosuppressive de ces cellules (Chen *et al.*, 2003). Ces cellules produisent alors du TGF- $\beta$  capable d'agir de façon autocrine et d'instaurer une boucle de rétroaction afin de soutenir leur expansion. Les protéines Smad2 et Smad3 sont activées en aval de la signalisation du TGF- $\beta$  pour induire l'expression de Foxp3. Smad3 participe également à la différenciation des iTreg en bloquant ROR $\gamma$ t (Martinez *et al.*, 2009). L'IL-2 provoque la phosphorylation de STAT5 qui va alors induire la transcription de *foxp3*. Dans ces conditions, STAT5 entre en compétition avec STAT3 pour la liaison au locus *Il17a*, conduit à la perte de modifications permissives des histones et réprime la différenciation Th17 au profit de celle des iTreg (Zhou *et al.*, 2008). L'activation du TCR provoque l'expression de DNMT1 et de DNMT3b (*DNA (cytosine-5)-MethylTransferase 1 et 3 $\beta$* ) qui vont s'accumuler et maintenir la méthylation du gène codant pour Foxp3, diminuant ainsi sa transcription. Le TGF- $\beta$  bloque l'accumulation de DNMT1 sur le locus *Foxp3* via l'activation de la voie p38 MAP kinase, autorisant la polarisation iTreg (Li *et al.*, 2013).

Les Th3 seraient impliqués dans la génération d'iTreg par les fortes quantités de TGF- $\beta$  qu'ils sécrètent (Carrier *et al.*, 2007a, b). Les cellules Tr1 sont induites en présence d'IL-10 (Groux, 2003). L'IL-27 sécrétée par les DC a été récemment impliquée dans leur induction, via l'inhibition des gènes associés au phénotype Th17 (Pot *et al.*, 2011). La présence concomitante d'IL-27 et d'IL21 autocrine amplifie leur différenciation. Cette polarisation repose sur l'expression des facteurs de transcription c-Maf et AhR et la présence de la

molécule ICOS (*Inducible T-cell CO-Stimulator*) (Apetoh *et al.*, 2010; Pot *et al.*, 2009). D'autre part, l'engagement de GITR (*Glucocorticoid-Induced TNFR-related protein*), CTLA-4 ou PD-1 peut favoriser leur induction (Fujio *et al.*, 2010). L'IL-35 convertit les lymphocytes T naïfs en iT35, à leur tour producteurs d'IL-35. Cette cytokine, identifiée récemment, supprime la prolifération des lymphocytes T.

### 6.3. Activité immunosuppressive et/ou protumorale des iTreg

Les cellules iTreg inhibent les réponses immunitaires antitumorales et sont donc impliquées dans l'immunosuppression de nombreux types de cancers (Ladoire *et al.*, 2011; Menetrier-Caux *et al.*, 2012). La séquestration de l'IL-2 est un des mécanismes de suppression associés aux iTreg. Leur forte avidité pour l'IL-2 s'explique par leur surexpression de CD25 qui conduit à la diminution des taux de cette cytokine dans le microenvironnement. L'IL-2 étant capitale pour l'activation des cellules NK et T CD4 et CD8 ainsi que pour la prolifération des effecteurs T, ce mécanisme peut donc avoir un impact sur les réponses innées et adaptatives (Pandiyani *et al.*, 2007). La co-expression de CD39 et CD73 permet aux iTreg de générer de l'adénosine immunosuppressive qui induit l'anergie des autres cellules T CD4. Leurs effets antiprolifératifs sur les autres populations cellulaires T sont médiées par les cytokines immunosuppressives qu'ils produisent (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35). Dans le cancer de l'ovaire, le recrutement de cellules iTreg dans la tumeur serait un événement majeur contribuant à l'immunosuppression et favorable au développement tumoral (Curiel *et al.*, 2004).

Néanmoins, des études chez l'Homme ont montré qu'un infiltrat tumoral riche en lymphocytes T exprimant Foxp3 était de bon pronostic dans les cancers colorectaux, les cancers ORL et les lymphomes non hodgkiniens (Fridman *et al.*, 2012) (*Tableau 4*, p. 65). La capacité des lymphocytes T Foxp3<sup>+</sup> à limiter l'inflammation et les réponses immunitaires antimicrobiennes (Ladoire *et al.*, 2011), ainsi que leur capacité à supprimer la prolifération des lymphocytes Th17 et leur production d'IL-17 (Crome *et al.*, 2010) au sein de la tumeur explique probablement le lien entre un fort infiltrat lymphocytaire T Foxp3<sup>+</sup> et un pronostic favorable dans ce type de cancer.

**Tableau 4. Corrélation entre nature des cellules immunes infiltrant la tumeur et pronostic clinique.**  
D'après (Fridman *et al.*, 2012).

Type de cancer	Infiltrat cellulaire				
	CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	Th1	Th2	Th17	Treg
Mélanome	Bon				Aucun Mauvais
Tête et cou	Bon			Aucun	Bon
Sein	Bon	Bon Aucun	Bon Aucun		Aucun Mauvais
Vessie	Bon				Bon
Ovaire	Bon	Bon	Mauvais	Bon	Bon Mauvais
Œsophage	Bon	Bon		Bon	
Colorectal	Bon	Bon	Aucun	Mauvais	Bon Aucun
Carcinome rénal à cellules claires	Bon Mauvais	Bon			Mauvais
Adénocarcinome prostatique	Bon			Bon	
Poumon	Bon Aucun	Bon		Mauvais	Mauvais
Pancréas	Bon		Mauvais		Mauvais
Col de l'utérus		Bon			
Cancer épidermoïde du canal anal					Aucun
Cerveau					aucun
Carcinome hépatocellulaire	Bon Mauvais	Bon		Mauvais	Mauvais
Estomac		Bon	Mauvais	Bon	
Médulloblastome		Bon			
Carcinome à cellules de Merkel	Bon				
Carcinome urothélial	Bon				
Lymphome folliculaire et lymphome de Hodgkin			Bon		Bon Aucun Mauvais

## 7. Les cellules Th9

### 7.1. Caractérisation et spécialisation fonctionnelle

D'abord apparentées à la sous-population Th2, les cellules Th9 ont été caractérisées seulement en 2008 (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008). Elles sont phénotypiquement décrites comme CCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> (Kara *et al.*, 2013). Leur différenciation repose sur l'expression des facteurs de transcription IRF4 (Staudt *et al.*, 2010) et PU.1 (*Spi-1 proto-oncogene*) (Chang *et al.*, 2010). Chez l'Homme comme chez la souris, les cellules Th9 sécrètent principalement l'IL-9 mais également l'IL-21 et les cellules murines peuvent encore produire l'IL-10. Les cellules Th9 sont principalement connues pour leur capacité à induire de fortes réponses pro-inflammatoires *in vivo*. En effet, le transfert adoptif de cellules Th9 induit le développement de la colite chez la souris (Dardalhon *et al.*, 2008). Elles favorisent le développement de maladies auto-immunes : encéphalomyélite auto-immune expérimentale chez la souris (Jager *et al.*, 2009) et sclérose en plaque chez l'Homme (Stassen *et al.*, 2012). Elles contribuent au développement des réponses allergiques et sont particulièrement impliquées dans l'asthme (Staudt *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2011). Si la plupart des fonctions effectrices des Th9 dépendent de leur production d'IL-9, notre équipe a récemment démontré leur implication dans l'immunité antitumorale *via* la production d'IL-21 sous l'effet de l'IL-1 $\beta$  (Végran *et al.*, 2014).

### 7.2. La régulation transcriptionnelle

Les Th9 sont induits en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-4 mais peuvent également résulter de la reprogrammation de cellules Th2 sous la stimulation de TGF- $\beta$  (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008). Les signalisations de l'IL-4 et du TGF- $\beta$  induisent respectivement l'expression d'IRF4 et de PU.1, deux facteurs transcriptionnels requis pour la polarisation Th9. Le TGF- $\beta$  induit PU.1 *via* Smad1. PU.1 se lie directement au promoteur du gène *il9* où il recrute les histones acétyltransférases Gcn5 et PCAF qui façonnent la chromatine de sorte à induire la transcription de ce gène (Goswami and Kaplan, 2012). Suite à l'engagement de l'IL-4R chez les Th9 en différenciation, on retrouve des niveaux de phosphorylation de STAT6 comparables à ceux présents chez les Th2. Puisque STAT6 dirige l'expression de GATA3, il apparaît que ces facteurs jouent également un rôle déterminant dans la polarisation Th9. En effet, GATA3 serait impliqué, non pas dans la transactivation du gène codant l'IL-9, mais comme répresseur de Foxp3 qui pourrait affecter le développement des cellules Th9

(Goswami *et al.*, 2012). Le rôle capital d'IRF4 est souligné par le fait qu'en son absence toute différenciation Th9 est impossible. IRF4 s'hétérodimérise soit avec PU.1, soit avec BATF, pour induire respectivement la transcription d'*il9* ou le programme transcriptionnel des Th9 (Jabeen *et al.*, 2013). Par ailleurs, nous avons démontré qu'IRF1 était impliqué dans la différenciation Th9 sous l'effet de l'IL-1 $\beta$  (Végran *et al.*, 2014). Ce facteur, initialement décrit comme essentiel à la génération de cellules Th1 fonctionnelles (Kano *et al.*, 2008), se comporte véritablement comme un *enhancer* du programme Th9 en se liant directement aux promoteurs de l'IL-9 et de l'IL-21, renforçant leur production par les Th9. Cependant, savoir si IRF1 agit seul ou coopère avec d'autres facteurs impliqués dans la polarisation Th9 reste à élucider.

### 7.3. Emergence d'un rôle antitumoral des Th9

Bien que la preuve d'une conversion des cellules Th9 en cellules productrices d'IFN- $\gamma$  ait été apportée (Jager *et al.*, 2009), présupposant leur capacité à limiter le développement tumoral *in vivo*, seules deux études chez la souris avaient jusqu'alors démontré leurs propriétés anticancéreuses dépendantes de l'IL-9 (Lu *et al.*, 2012; Purwar *et al.*, 2012). Notre équipe a dernièrement mis en évidence que les propriétés antitumorales des cellules Th9 étaient renforcées en présence d'IL-1 $\beta$  et strictement dépendantes de l'IL-21 produite par ces cellules (Végran *et al.*, 2014). Dans ce contexte expérimental, les cellules Th9 générées en présence d'IL-1 $\beta$  conservent leur capacité sécrétoire d'IL-9 et d'IL-21 *in vivo* dans les jours qui suivent leur transfert adoptif. L'IL-1 $\beta$  stabilise donc le phénotype Th9, alors peu plastique, et n'autorise pas la transdifférenciation en un autre sous-type effecteur qui pourrait compromettre le rejet de la tumeur. Toutefois, aucun consensus n'est à ce jour fait autour de l'implication des Th9 dans les maladies néoplasiques chez l'Homme. Une seule étude relate leurs effets délétères chez des patients présentant un épanchement pleural malin, soutenant la prolifération et la dissémination des cellules cancéreuses (Ye *et al.*, 2012b).

## 8. Les cellules TFh

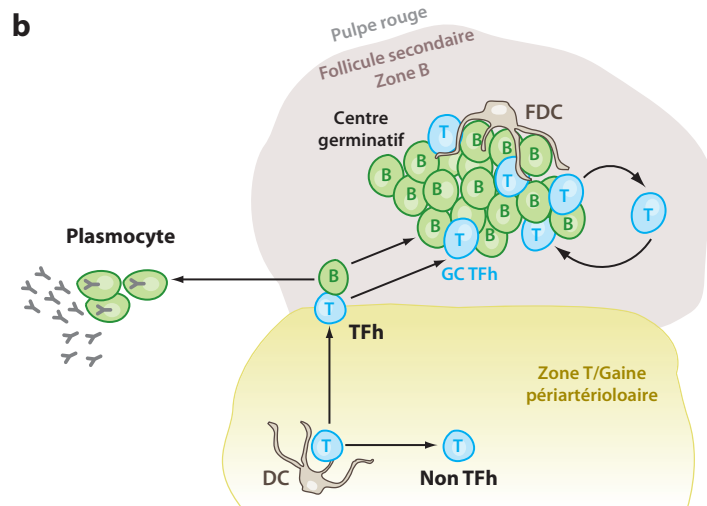
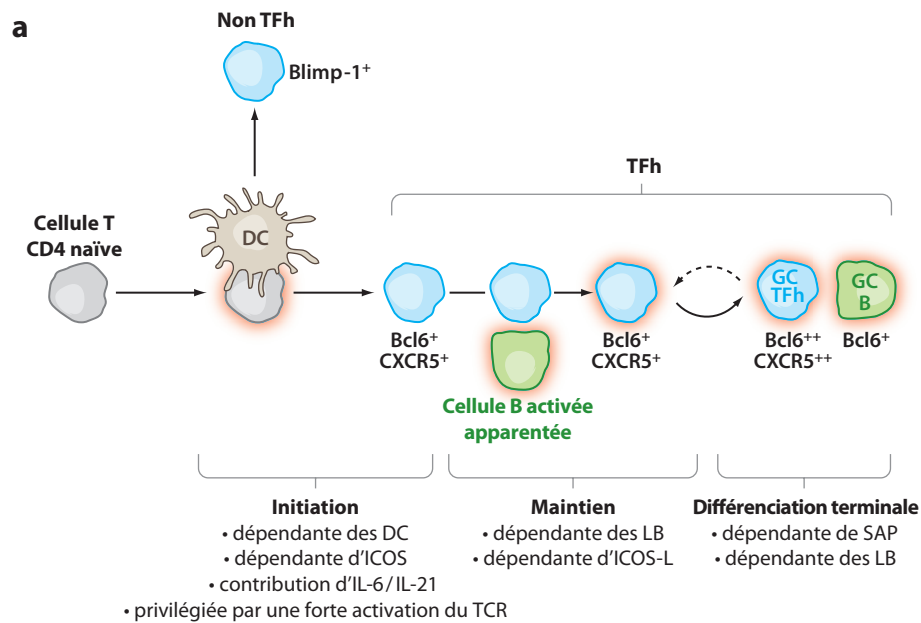
### 8.1. Caractérisation et spécialisation fonctionnelle

La caractérisation des cellules T folliculaires helper (TFh) constitue une avancée récente majeure dans le domaine de la polarisation T CD4. Elles ont été initialement décrites dans les tissus lymphoïdes secondaires chez l'Homme (Breitfeld *et al.*, 2000; Schaerli *et al.*, 2000). Les TFh expriment le récepteur de chémokine CXCR5 ce qui contribue à leur localisation au sein des follicules lymphoïdes B où ils favorisent la différenciation et la maturation des lymphocytes B. Le *homing* exercé par la chémokine CXCL13, ligand de CXCR5, permet la migration folliculaire des TFh. Ils contribuent ainsi à la formation de centres germinatifs (CG) et à la production d'anticorps de haute affinité *via* le processus de commutation de classe des immunoglobulines (Ig) subi par les cellules B (processus essentiel à la diversité fonctionnelle des réponses anticorps). Les TFh sont caractérisés par l'expression de marqueurs de surface spécifiques (CXCR5, ICOS, PD-1), les facteurs de transcription Bcl-6 et *Ascl2* (*Achaete-Scute Complex Homolog 2*) et la production d'IL-21 (Liu *et al.*, 2014; Tangye *et al.*, 2013). En plus de leur cytokine canonique qu'est l'IL-21, ils peuvent sécréter l'IL-4, l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-10. Cette plasticité permet d'adapter la réponse humorale à l'agent infectieux détecté en orientant le *switch* isotypique des Ig (Reinhardt *et al.*, 2009). L'activité aberrante des TFh est associée à de multiples pathologies immunes telles que les maladies auto-immunes, les immunodéficiences primaires ou acquises et les lymphomes T folliculaire et angio-immunoblastique (Tangye *et al.*, 2013).

### 8.2. La régulation transcriptionnelle

Il y a encore peu de temps, il n'était pas clairement établi si ces cellules étaient un sous-type cellulaire à part entière ou le produit d'une différenciation phénotypique d'autres profils de lymphocytes T auxiliaires (Crotty, 2011). Plusieurs modèles ont été débattus ces dernières années pour expliquer la génération des cellules TFh, opposant les TFh naissants dans le centre germinatif (GC TFh) CXCR5<sup>hi</sup> PD-1<sup>hi</sup> et les TFh périphériques CXCR5<sup>hi</sup> PD-1<sup>low</sup>. Ces deux catégories de cellules sont induites après vaccination ou infection mais la proportion de GC TFh a été décrite pour décroître plus rapidement, suggérant que leur fonction effectrice est de courte durée. Cette diminution du nombre de GC TFh résulte en partie de la perte du phénotype TFh plutôt que du processus d'apoptose qui accompagne souvent l'inactivation des cellules T auxiliaires différenciées. Alors, les TFh présentant une moindre expression de





**Figure 8. Modèle intégratif de la différenciation cellulaire TFh.**

**a)** La différenciation TFh est un processus multi-étapes incluant une phase d'initiation, une phase de maintien et une dernière étape de différenciation terminale. Les signaux requis pour ces étapes de différenciation sont indiqués. Les cellules TFh sont décrites comme CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> Bcl-6<sup>+</sup> et sont donc considérées comme un sous-type à part entière. **b)** Les zones où s'effectue la polarisation des cellules TFh sont localisées dans les organes lymphoïdes secondaire (rate, ganglions lymphatiques). D'après (Crotty *et al.*, 2011).

PD-1 (mais aussi de CXCR5 et de Bcl-6) vont exprimer à nouveau les marqueurs CCR7 et CD62L pour générer des cellules de type mémoire capables de retourner au ganglion et ainsi persister pendant une longue période (Tangye *et al.*, 2013). Des preuves chez la souris soutiennent l'idée que les TFh sont capables de générer un pool de cellules mémoires rapidement réactivables après une seconde stimulation, conférant une protection à long terme. On distingue donc les GC TFh effecteurs des TFh mémoires (*Tableau 5*, ci-dessous).

**Tableau 5. Caractérisation phénotypique des cellules TFh chez l'Homme et la souris.** D'après (Crotty, 2011)

Marqueur	Homme		Souris		Cellule T CD4 naïve	Cellule T CD4 non TFh
	TFh	GC TFh	TFh	GC TFh		
<i>CXCR5</i>	+	++	+	++	—	— <sup>a</sup>
<i>Bcl-6</i>	+	++	+	++	—	—
<i>PD-1</i>	+	++	+	++	—	variable
<i>ICOS</i>	+	++	+	+	—	variable
<i>SAP</i>	normal	high	normal	high	normal	normal
<i>IL-21</i>	+	++	+	++	—	variable
<i>CXCR4</i>	normal	high	high mRNA	high mRNA	normal	normal
<i>CXCL13</i>	low	high	—	—	—	—
<i>BTLA</i>	normal	high	high	high	normal	low
<i>SLAM</i>	inconnu	inconnu	normal	normal	normal	variable <sup>b</sup>
<i>CCR7</i>	low	low	low	low	high	variable
<i>CD200</i>	-/+	+	+	+	—	—
<i>IL-4</i>	—	+	—	+	—	Th2 <sup>+</sup>

**a)** Les cellules T CD4 humaines (mais pas murines) activées *in vitro* sur-expriment CXCR5 de façon transitoire après forte stimulation du TCR et de CD28 (M. Kroenke and S. Crotty, données non publiées). **b)** La plupart des cellules Th1 et Th2 expriment fortement SLAM.

En termes de signalisation moléculaire, l'IL-6 et l'IL-21 sont les principales cytokines décrites pour induire la différenciation des cellules TFh. Elles activent principalement STAT3 après transduction du signal *via* la voie JAK/STAT mais l'IL-6 active également STAT1 (Tormo *et al.*, 2012). L'association de STAT1/3 induit la transcription du gène codant BATF qui provoquera l'expression de CXCR5. De même, Ascl2 a été très récemment décrit pour transactiver le gène codant CXCR5. Parallèlement, la succession d'interactions spatio-temporelles entre la cellule T et différentes populations de CPA conduit à l'expression du facteur de transcription Bcl-6 essentiel à l'initiation de la différenciation TFh (Nurieva *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009) (*Figure 8*, p. 69). De même, la force du signal transduit par le TCR semble déterminante pour

initier ce processus de polarisation (Fazilleau *et al.*, 2009). Dans la zone T des OLS, la présentation antigénique concomitante à l'engagement de la molécule de costimulation ICOS, induit l'expression de Bcl-6 et consécutivement celle de CXCR5. L'expression de CXCR5 est donc acquise au cours des stades précoces de différenciation des TFh ; son rôle est essentiel à la migration trans-endothéliale des TFh vers les follicules des OLS. Au niveau de la bordure T/B des OLS, l'interaction des TFh avec les cellules B, toujours dépendante de l'engagement d'ICOS (Choi *et al.*, 2011) permet le maintien de l'expression de Bcl-6 dans les TFh et l'acquisition par ces cellules de caractéristiques phénotypiques effectrices. La différenciation terminale des TFh conduirait alors à la formation de CG où s'opèrent la maturation des LB et leur développement en plasmocytes pérennes de haute affinité ou la génération de LB mémoire. Cette dernière étape serait conditionnée par la liaison de l'intégrine membranaire SAP (*SLAM-Associated Protein*) présente sur les TFh sur son récepteur exprimé à la surface des LB (Cannons *et al.*, 2010). L'expression de CXCL13 constitue une caractéristique singulière des TFh humains et sa sécrétion conditionnerait l'architecture fonctionnelle des centres germinatifs.

### 8.3. Emergence d'un rôle antitumoral des TFh

Bien que des travaux suggèrent que les TFh pourraient promouvoir une tolérance induite par la tumeur (Rawal *et al.*, 2013), deux études récentes associent les TFh infiltrant les tumeurs à un meilleur pronostic des cancers du sein (Gu-Trantien *et al.*, 2013) et du côlon (Bindea *et al.*, 2013). Ainsi, les TFh associés aux tumeurs peuvent être dichotomisés en deux catégories : celle où les cellules néoplasiques sont d'origine lymphocytaire et arborent elles-mêmes un phénotype de type TFh et celle où les cellules tumorales sont distinctes des TFh mais dans lesquelles les TFh semblent jouer un rôle prépondérant.

Les lymphocytes T néoplasiques d'aspect TFh ont été essentiellement décrits dans les lymphomes T angio-immunoblastiques où les cellules malignes partagent non seulement des caractéristiques phénotypiques (expression de CXCL13, CXCR5, SAP, ICOS et Bcl-6) mais également fonctionnelles des TFh (ici, il s'agit d'une expansion incontrôlée des cellules B). Ce type de cellules néoplasiques a aussi été mis en évidence dans les lymphomes indolents. Enfin, l'examen des TFh, non pas en tant que cellules malignes mais comme cellules

associées à la tumeur, a révélé leur rôle délétère favorisant la progression de cancers hématologiques.

Dans le cas de tumeurs solides, des preuves indirectes ont d'abord suggéré la valeur pronostique bénéfique des cellules TFh (cancer du poumon non à petites cellules, cancer ovarien, mélanome, cancer du sein à forte activité proliférative) avant d'impliquer directement ces cellules dans l'immunité antitumorale. Chez des patientes atteintes de cancer du sein non préalablement traité, la présence de TFh au niveau des structures lymphoïdes tertiaires localisées en bordure de la tumeur fonctionnaliserait ces structures et soutiendrait la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale efficace (Gu-Trantien *et al.*, 2013). L'analyse transcriptomique différentielle de tumeurs faiblement ou fortement infiltrées a permis d'établir une signature génique TFh de huit gènes préférentiellement exprimés dans les tumeurs infiltrées (CD200, CXCL13, PD-1, ICOS, SAP, SGPP2, VSTM3 et FLF37440). La valeur pronostique de CXCL13 est donc parfaitement corrélée à celle de la signature TFh et reflète un meilleur taux de survie sans récurrence à dix ans. De plus, l'expression de CXCL13 dans les tumeurs mammaires a notamment été proposée comme facteur prédictif de la réponse à la chimiothérapie néo-adjuvantes. Les principales sources de CXCL13 sont les lymphocytes TFh mais aussi les cellules tumorales elles-mêmes. Ainsi, l'infiltrat intratumoral de TFh se révélerait être à la fois un facteur prédictif de réponse au traitement et pronostique de l'évolution de la maladie. De même dans le cancer colorectal, l'axe CXCL13/IL-21 est associé aux TFh et cellules B elles-mêmes inversement corrélées au grade de la maladie et donc reliées à une issue clinique favorable (Bindea *et al.*, 2013).

## 9. Les cellules Th22

### 9.1. Caractérisation et spécialisation fonctionnelle

En 2009, une dernière catégorie de cellules T effectrices a été identifiée et nommée d'après la cytokine qui les caractérise : les Th22 (Duhén *et al.*, 2009; Trifari *et al.*, 2009). Jusque-là, les cellules productrices d'IL-22 étaient considérées comme Th17. Toutefois, les Th22 sécrètent l'IL-13, l'IL-26 et le TNF- $\alpha$  en plus de l'IL-22 mais pas l'IL-17, ni l'IFN- $\gamma$  ce qui les distingue de la sous-population Th17. L'IL-22 ayant des propriétés cicatrisantes, ces cellules ont été identifiées dans la peau inflammatoire. En effet, les marqueurs phénotypiques qui les caractérisent associent CCR6, CCR4 et CCR10. La présence de CCR4 et CCR10, impliqués dans le *homing* cutané, est cohérente avec le rôle majeur de l'IL-22 dans l'inflammation cutanée. Leur fonction est d'assurer la communication entre le système immunitaire et les cellules non-hématopoïétiques. Leurs marqueurs de surface en font un bon candidat pour jouer ce rôle au sein des barrières entre l'hôte et l'environnement. Par ailleurs, l'IL-22 est douée d'une activité de défense muqueuse en induisant la production de peptides antimicrobiens, les  $\beta$ -défensines. Enfin, le rôle pathologique des Th22 a été démontré dans le psoriasis, la dermatite atopique et la polyarthrite rhumatoïde (Eyerich *et al.*, 2009; Kagami *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

Il est important de préciser qu'en plus des Th1, Th17 et Th22, d'autres populations cellulaires sont également une source non négligeable d'IL-22 et notamment les cellules T non conventionnelles ou les cellules lymphoïdes innées (*ILC: Innate Lymphoid Cells*) impliquées dans le remodelage tissulaire.

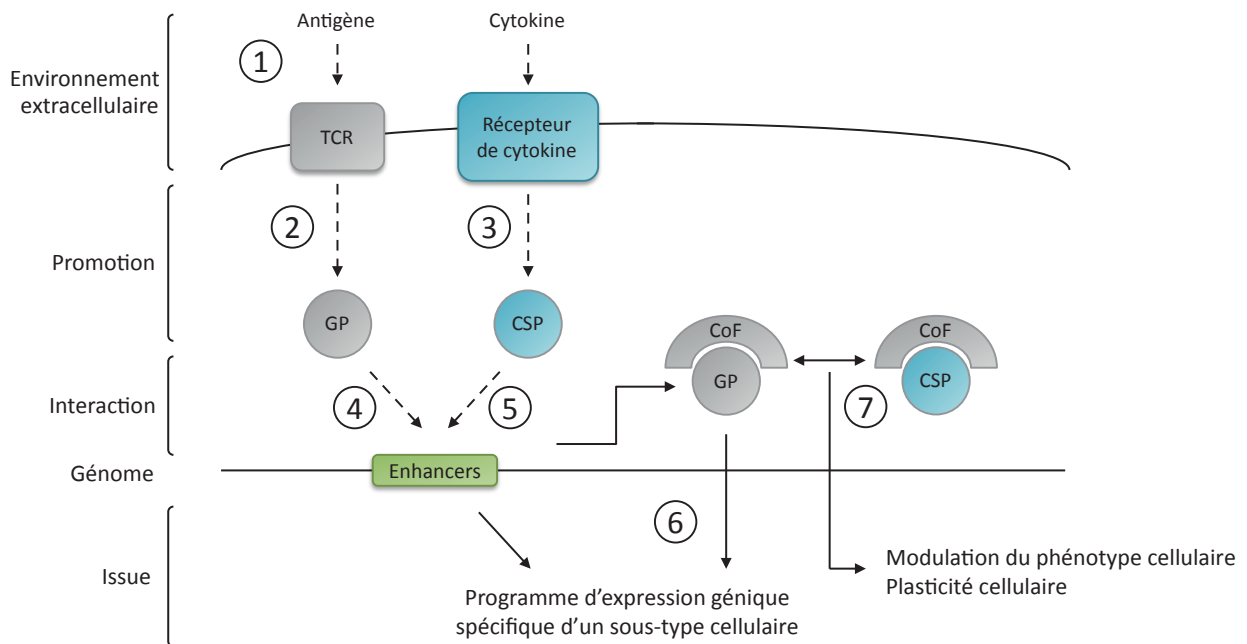
### 9.2. La régulation transcriptionnelle

Les cellules de Langerhans et les DC plasmacytoïdes retrouvées dans le derme stimulent la différenciation des cellules Th22. Bien que le programme transcriptionnel des Th22 soit induit en présence de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette polarisation restent mal caractérisés à ce jour (Ouyang *et al.*, 2011). Néanmoins, le facteur de transcription AhR semble indispensable à l'initiation de leur différenciation sans pour autant connaître son mode d'action. AhR est un facteur de transcription cytoplasmique reconnaissant de nombreux métabolites endogènes et toxines environnementales comme ligands activateurs. L'expression d'AhR est également requise pour la production d'IL-22 qui

soutiendra l'expansion clonale Th22. En retour, l'IL-22 se fixera à son récepteur hétérodimérique combinant les sous-unités IL-22R1 et IL-10R2 et induira une signalisation par la voie JAK/STAT faisant intervenir JAK1 (*Janus kinase 1*), Tyk2 (*Tyrosine kinase 2*) et STAT3. De plus, une régulation fine semble s'opérer avec d'autres facteurs transcriptionnels tels que BATF, T-bet, ROR $\gamma$ t et les facteurs associés au programme transcriptionnel Th17.

### 9.3. Résultats préliminaires des fonctions délétères des Th22 dans le cancer

Si les cellules Th22 sont plutôt dévolues au maintien de l'homéostasie immunitaire et tissulaire en cas d'inflammation, les processus inflammatoires soutiennent potentiellement la progression tumorale ; l'intérêt d'investiguer l'impact des Th22 dans la pathologie cancéreuse semble donc pertinent. Mais, peu de travaux documentent le rôle des cellules Th22 dans un contexte de cancer. Néanmoins, une action protumorale semble leur être associée depuis peu. La présence de Th22 serait en effet un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer gastrique ou présentant un épanchement pleural malin (Ye *et al.*, 2012a; Zhuang *et al.*, 2012). En outre, ces cellules seraient associées à la progression du carcinome hépatocellulaire (Qin *et al.*, 2014).



**Figure 9. Schéma récapitulatif du contrôle de la différenciation cellulaire T CD4 via l'interaction entre facteurs de transcription.**

**1)** L'environnement extracellulaire est perçu par la cellule T CD4 au travers des cytokines et des antigènes qui s'y trouvent. **2)** L'engagement du TCR mène à l'activation de facteurs transcriptionnels généraux à action promotrice (GP) tels que NFAT et AP-1. **3)** De plus, la stimulation cytokinique conduit à l'activation de facteurs promoteurs spécifiques de cytokine (CSP) comme les STAT. **4)** Ensemble, ces facteurs influencent les capacités activatrices (enhancers) du génome entier et **5)** l'expression de facteurs de transcription spécifiques d'un sous-type (LSF1). **6)** L'interaction entre facteurs de régulation spécifiques d'une sous-population, cofacteurs et chromatine façonnée résulte en l'expression d'un programme génique spécifique d'un sous-type cellulaire. **7)** Des facteurs de transcription associés à d'autres sous-types effecteurs (LSF2) peuvent aussi être exprimés ce qui autorise la modulation du phénotype cellulaire et soutient la plasticité inhérente aux cellules T CD4. D'après (Evans and Jenner, 2013).

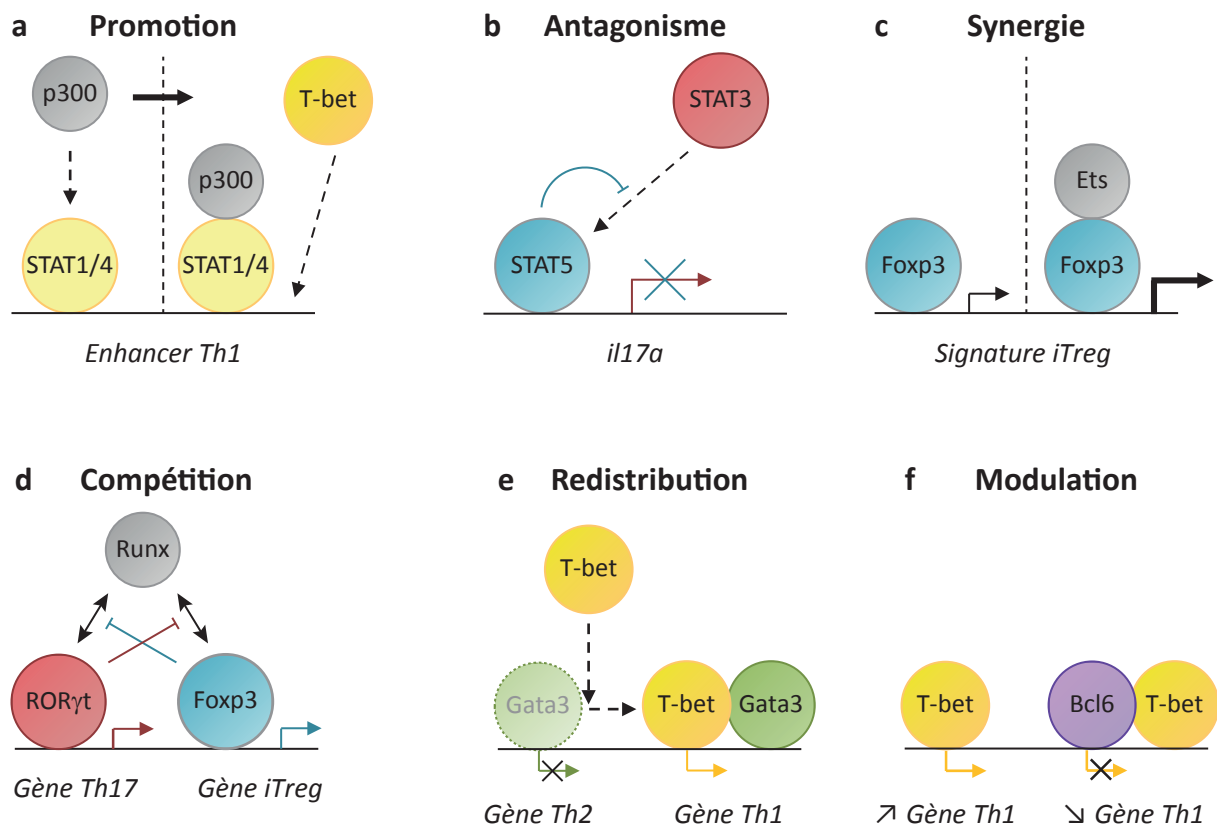
## 10. La plasticité des cellules T CD4 soutient leur transdifférenciation

### 10.1. Des facteurs environnementaux aux modifications épigénétiques

La plasticité cellulaire se manifeste par la conversion d'un sous-type lymphocytaire en un autre. La balance cytokinique est l'un des éléments responsables de ce phénomène qui peut aussi être appelé déviation lymphocytaire. En effet, selon les cytokines sécrétées, la différenciation en un sous-type lymphocytaire peut être inhibée ou, au contraire, favorisée. Par exemple, lorsque les cellules Th2 sont incubées en présence de TGF- $\beta$ , la production d'IL-4 est inhibée tandis que celle d'IL-9 est induite. Les cellules Th2 peuvent ainsi être reprogrammées et différenciées en cellules Th9 (Veldhoen *et al.*, 2008). C'est la dose de TGF- $\beta$  qui détermine l'ampleur de cette conversion lymphocytaire. A ce titre, les facteurs de transcription IRF4 et PU.1 seraient responsables de la déviation des cellules Th2 en Th9 (Veldhoen, 2010). La flexibilité de la différenciation cellulaire résulte aussi de la force du signal du TCR, des modifications épigénétiques des gènes cibles des facteurs de transcription et de l'interaction avec d'autres types cellulaires rencontrés (Locksley, 2009; O'Shea *et al.*, 2008). Les cellules s'adaptent ainsi aux modifications de l'environnement dans lequel elles se trouvent (*Figure 9*, p. 75).

L'analyse différentielle de l'état de la chromatine parmi les cellules T au repos ou activées (Th1, Th2, Th17 et iTreg) a révélé que les gènes spécifiant les sous-populations T auxiliaires pouvaient exprimer à la fois des marques permissives et répressives de recrutement de facteurs transcriptionnels (Wei *et al.*, 2009). L'état bivalent de ces gènes conditionne tantôt l'activation, tantôt l'inhibition des facteurs de transcriptionnels impliqués dans la polarisation des cellules T CD4 et suggère que ces cellules conservent un potentiel de révision fonctionnelle. De façon intéressante, l'examen du locus *Il21* a démontré que la transcription de ce gène est fortement réprimée au sein des cellules Th1, Th2 et iTreg tandis qu'elle est hautement activée chez les cellules TFh. Enfin, les approches de génomique fonctionnelle ont permis d'établir clairement plusieurs modes d'interaction entre les facteurs de transcription exprimés au sein de la cellule (Evans and Jenner, 2013). On distingue ainsi : a) la liaison précoce de protéines à l'ADN qui promeut l'action de facteurs spécifiques à la différenciation d'un sous-type, b) l'antagonisme entre facteurs mutuellement exclusifs interagissant sur un même site du génome, c) la synergie entre facteurs, d) la compétition pour un même cofacteur, e) la redistribution d'un facteur par un





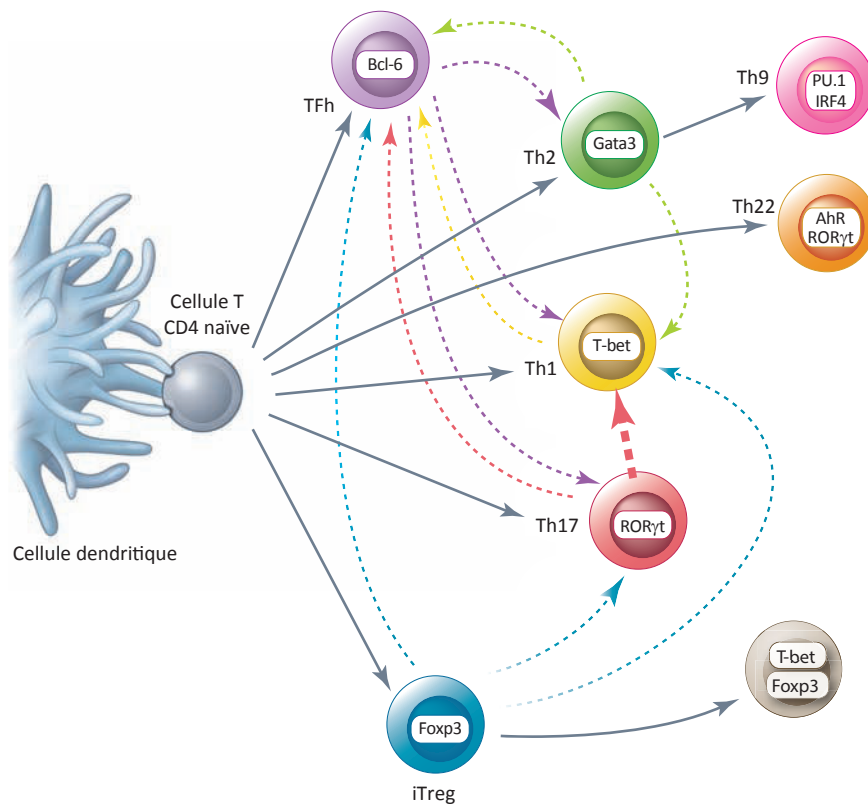
**Figure 10. Les modes d'interaction entre facteurs de transcription.**

**a)** Les facteurs transcriptionnels clés « pionniers » façonnent le paysage épigénétique de sorte à ce que d'autres facteurs interagissent sur des sites de régulation afin de promouvoir la transcription de gènes cibles. **b)** Les facteurs de transcription peuvent antagoniser les fonctions d'autres. C'est le cas de STAT5 qui est associé à la différenciation iTreg et qui supprime les fonctions effectrices Th17 en bloquant l'activation et la liaison de STAT3 sur le locus *Il17a*. **c)** Les facteurs de transcription clés (tels que Fxp3) peuvent s'associer de façon synergique à des co-facteurs (comme Ets) afin d'augmenter l'expression de gènes et produire une signature cellulaire T plus robuste. **d)** Des phénomènes de compétition pour un cofacteur mutuel peuvent exister. A titre d'exemple, RORγt et Fxp3 entrent en compétition pour la liaison à Runx1, suite à laquelle une inhibition réciproque de l'activité de l'un ou l'autre surviendra. **e)** Un facteur de transcription peut être redistribué à un nouveau site d'interaction. T-bet séquestre Gata3 loin des cibles géniques Th2 et le redistribue au niveau des cibles géniques associées au phénotype Th1. **f)** L'activité transcriptionnelle d'un facteur peut être modulée par d'autres ; c'est notamment le cas de T-bet dont l'activité est réprimée par Bcl6. D'après (Evans and Jenner, 2013).

autre et f) la modulation réciproque de l'activité régulatrice de facteurs de transcription (Figure 10, p. 77).

### 10.2. L'instabilité cellulaire et l'interdépendance des sous-types cellulaires T CD4

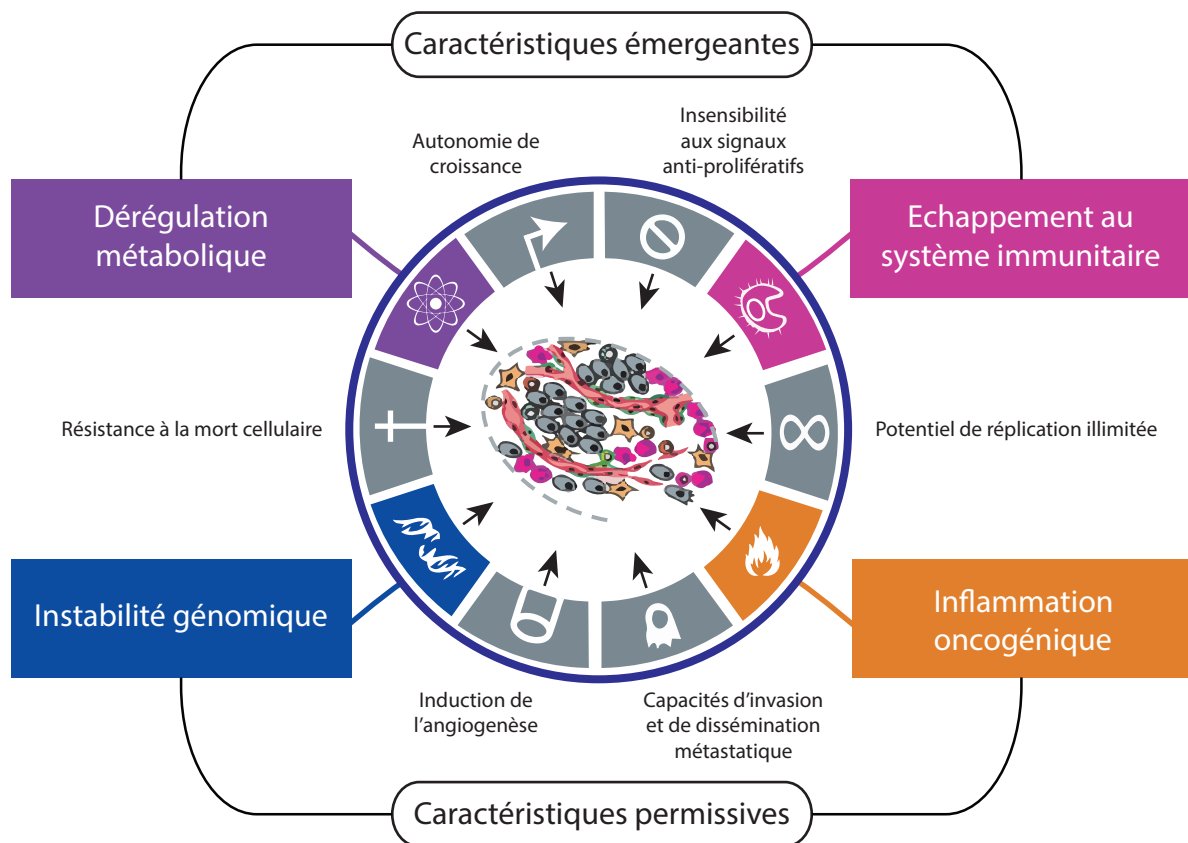
Bien que les sous-types Th1/Th2 aient été conceptuellement décrits comme mutuellement exclusifs, des preuves s'accumulent concernant la plasticité des populations lymphocytaires T CD4 (O'Shea and Paul, 2010; Zhou *et al.*, 2009) (Figure 11, p. 79). Généralement, la conversion d'un sous-type lymphocytaire en un autre se produit lorsque la cellule est instable, ce qui n'est pas (ou peu) le cas des cellules Th1 et Th2 différenciées. Contrairement aux cellules Th1/Th2, définies comme peu plastiques, les Th17 peuvent changer de phénotype quel que soit leur stade de différenciation (Zhu and Paul, 2010). En effet, les cellules Th17 sont particulièrement instables et peuvent se convertir en Th1 sous l'effet de l'IL-12. Leur plasticité se manifeste également par leur capacité à se différencier en iTreg à la faveur d'un environnement riche en TFG- $\beta$ . Réciproquement, les iTreg sont capables de dévier sous l'effet de l'IL-6 soit vers un phénotype Th17 soit TFh dans les plaques de Peyer (Luckheeram *et al.*, 2012). En outre, il a été montré que les cellules Th9 pouvaient se convertir *in vivo* en cellules productrices d'IFN- $\gamma$  (Jager *et al.*, 2009). Enfin, les cellules TFh apparaissent également très plastiques. Un élément de réponse est apporté par le fait que Bcl-6 coopère avec de nombreux facteurs de transcription enrôlés dans d'autres voies de différenciation lymphocytaire T CD4 (Crotty, 2014).



**Figure 11. La flexibilité et la plasticité cellulaire T CD4.**

Un ensemble de travaux démontre une flexibilité dans la production des cytokines produites par les cellules T CD4 et une plasticité entre ces sous-types. Les cellules T CD4 sont en effet capables de changer leur profil de sécrétion cytokinique et l'expression de facteurs de transcription définissant initialement un phénotype peut être transitoire ou demander la coopération d'autres facteurs. D'après (O'Shea and Paul, 2010).

En somme, la grande diversité des réponses T CD4 effectrices est liée à l'expression de facteurs de transcription clés spécifiant chaque sous-type, ces derniers permettant la régulation de l'expression des gènes de cytokines instruisant la différenciation des effecteurs T CD4. Mais, l'unique expression de ces facteurs transcriptionnels « maîtres » ne semble pas la seule condition déterminant le devenir des cellules T CD4 en différenciation. Les modifications épigénétiques façonnent la chromatine et influencent la liaison de facteurs protéiques aux régions promotrices de gènes spécifiques ; elles contribuent ainsi à l'engagement réversible des cellules T CD4 vers l'un ou l'autre des phénotypes possibles. Ce qui apparaissait alors comme une classification très stricte des sous-populations lymphocytaires il y a quelques années est maintenant envisagée de façon beaucoup plus souple. Il est dorénavant bien établi qu'il existe une interaction et une relative plasticité entre sous-types. La compréhension de certains de ces mécanismes restent, toutefois, encore parcellaire. La nécessité d'améliorer nos connaissances dans ce domaine, en se basant notamment sur les réponses apportées par les techniques puissantes d'analyse du génome, permettra d'anticiper les effets des thérapeutiques immunomodulatrices ciblées et d'envisager le recours à une immunothérapie intégrative en association avec les thérapies conventionnelles pour lever les barrières actuelles et induire une réponse immunitaire plus efficace.



**Figure 12. Les 10 caractéristiques fondamentales des cellules tumorales.**

Les cellules transformées se distinguent des cellules saines par l'acquisition d'anomalies fonctionnelles communes. Ces anomalies fonctionnelles sont l'aboutissement d'un processus multi-étapes, l'oncogenèse, au cours duquel l'environnement n'est pas neutre. L'inflammation chronique est considérée comme une condition précancéreuse. L'échappement à l'immunosurveillance est également admis comme l'une de ces caractéristiques fondamentales régissant la transformation cellulaire maligne. D'après (Hanahan and Weinberg, 2011).

### III. Le microenvironnement tumoral comme cible d'immunomodulation

L'étude du microenvironnement tumoral a pris ces dernières années une place importante dans le domaine de la recherche sur le cancer. En effet, il est désormais admis que le caractère invasif d'un cancer primitif est déterminé non seulement par le génotype des cellules tumorales, mais aussi par leurs interactions avec l'environnement extracellulaire qui module les capacités de développement de la tumeur. Sachant que le pronostic de la maladie cancéreuse est très directement lié au caractère invasif de la tumeur primitive et à ses éventuelles métastases, l'acquisition de connaissances fondamentales sur les mécanismes de l'oncogenèse liée au microenvironnement tumoral représente une orientation scientifique essentielle pour l'amélioration des thérapies actuelles et le développement de nouvelles approches. Si plusieurs obstacles à la réussite des thérapies anticancéreuses persistent, la résolution du conflit majeur entre le système immunitaire de l'hôte et le microenvironnement tumoral revêt un véritable enjeu thérapeutique. En effet, le dialogue établi entre les cellules tumorales et les composants cellulaires et moléculaires de leur environnement influence la progression de la tumeur. De ce fait, la caractérisation du rôle joué par le microenvironnement est devenue un objectif crucial de la recherche en cancérologie, tant à visée cognitive qu'en termes d'applications cliniques.

#### 1. Les dix caractéristiques fondamentales de la cellule tumorale

Bien que dérivant de cellules du « soi », les cellules tumorales sont caractérisées par une grande instabilité génétique responsable de la formation de néo-antigènes ou de l'expression ectopique ou anormalement élevée de molécules les distinguant des cellules du « soi ». La caractérisation des altérations génétiques et épigénétiques affectant les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes a permis de poser les principes fondamentaux de la biologie du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011) (*Figure 12*, p. 81). À l'image de la théorie de l'évolution des espèces selon Darwin, le développement d'une tumeur maligne est ainsi classiquement présenté comme un processus de sélection de cellules ayant acquis six anomalies principales leur conférant un avantage de croissance, suivies de vagues d'expansions clonales. Cette notion d'avantage de croissance inclut : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de prolifération, l'échappement au processus de vieillissement cellulaire (sénescence réplivative) et à la mort cellulaire programmée (apoptose), l'acquisition de capacités anormales de division, à induire la

néoangiogenèse et des capacités d'invasion et de dissémination à distance (formation de métastases). L'instabilité génomique et l'occurrence de mutations initient véritablement la transformation oncogénique. Les adaptations métaboliques qui surviennent au cours de ce processus soutiennent également la prolifération indéfinie des cellules tumorales. Le développement d'une pathologie cancéreuse n'est cependant pas limité à l'accumulation d'anomalies intrinsèques. En effet, au cours de ces dix dernières années, de très nombreuses observations ont mis en exergue l'importance des interactions entre les cellules précancéreuses et cancéreuses avec leur microenvironnement au cours des différentes étapes de l'évolution de la pathologie. Ainsi, l'échappement à la réponse immunitaire et la mise en place d'une inflammation chronique ont été décrits comme caractéristiques extrinsèques participant à la progression de la tumeur.

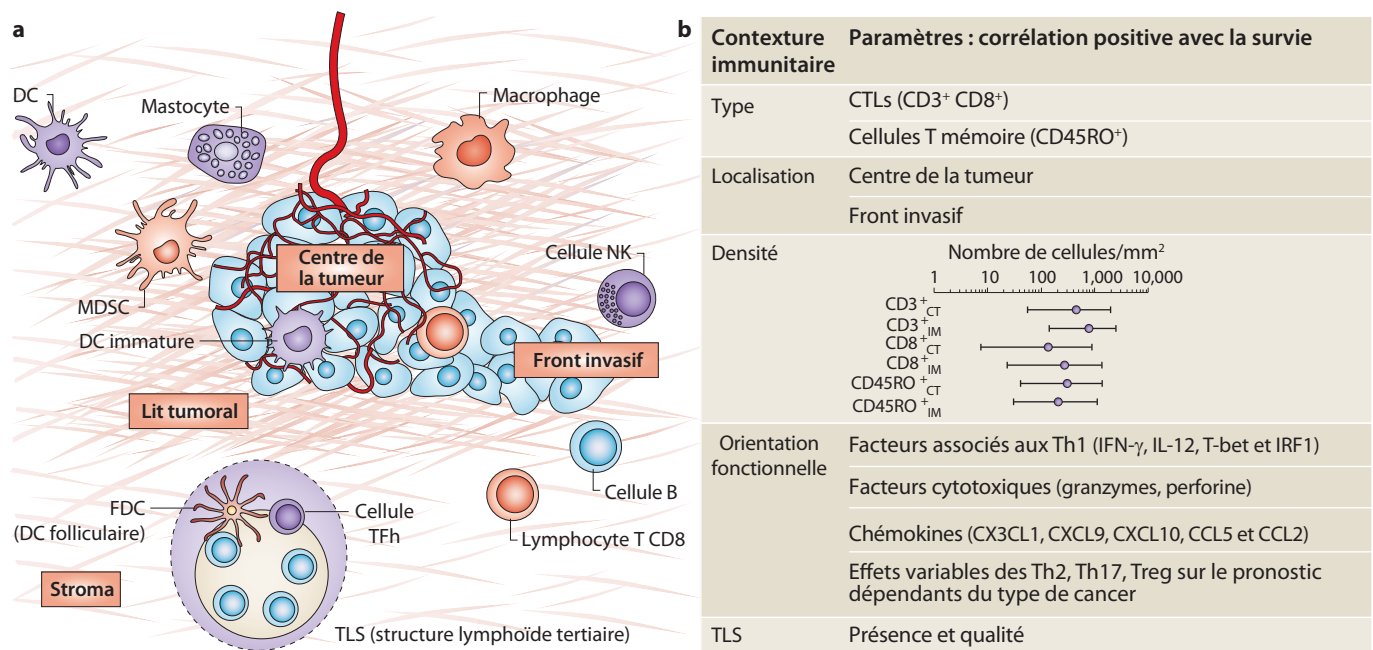
## **2. Les microenvironnements normal et tumoral**

Le microenvironnement normal est complexe et dynamique. Sa composante cellulaire englobe toutes les cellules avoisinantes : les cellules adjacentes appartenant au même tissu et les cellules résidant dans leur environnement direct (fibroblastes, cellules endothéliales vasculaires, cellules dendritiques, lymphocytes...). Ces cellules baignent dans la matrice extracellulaire (MEC), qui est un élément déterminant du microenvironnement. C'est en interagissant avec les composants de la MEC que la cellule peut s'ancrer à une localisation particulière ou au contraire, migrer et se déplacer. Les éléments de la MEC sont multiples et comportent des macromolécules formant un gel hydraté (acide hyaluronique, protéoglycannes), des protéines fibrillaires (collagènes) et des protéines structurales (laminines, fibronectines...), capables d'interagir directement avec les cellules et de moduler de nombreuses fonctions biologiques. Les facteurs solubles, sécrétés par une multitude de cellules, jouent un rôle essentiel dans la modulation du microenvironnement. En effet, ces petites molécules peuvent agir à distance de la cellule les ayant sécrétées et peuvent avoir des effets non négligeables. Certaines activent des voies de signalisation modifiant l'expression de nombreuses protéines contrôlant le cycle cellulaire, la morphologie de la cellule, sa polarité, son ancrage à la MEC... D'autres participent au recrutement de cellules du système immunitaire et/ou guident la migration cellulaire (par chimiotactisme par exemple). D'autres encore, comme les facteurs de croissance angiogéniques ou les molécules de guidage, induisent et régulent la néoangiogenèse.

En conditions physiologiques, le microenvironnement joue un rôle de suppresseur de tumeur. À l'inverse, une perturbation de l'homéostasie du microenvironnement peut avoir des effets pro-oncogéniques et favoriser la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses. Ainsi, tandis que la phase précoce de l'inflammation, dite aigüe, est dévolue à l'élimination d'un pathogène et/ou la réparation du tissu lésé, la mise en place d'une réponse inflammatoire non maîtrisée, peut engendrer des bouleversements profonds délétères à l'organisme. Cette inflammation chronique conduit à la libération excessive de médiateurs de l'inflammation que sont certaines cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6 principalement), de nombreuses chémokines (CCL2, CCL5, CCL20, CXCL8...) et d'autres molécules comme par exemple les composés chimiotactiques lipidiques (leucotriènes, prostaglandines et le facteur d'activation plaquettaire (PAF : *Platelet Activating Factor*). Le gradient chimiotactique impose alors la mobilisation excessive de populations cellulaires impliquées dans l'inflammation, capables de bloquer la phase de résolution et donc d'entretenir la chronicité de cette réponse exagérée. Les processus inflammatoires chroniques peuvent donc participer au développement de la pathologie cancéreuse (Cousens *et al.*, 2013; Trinchieri, 2012).

De même, la transformation cellulaire entraîne des modifications du microenvironnement des cellules tumorales. Le stroma tumoral diffère du microenvironnement normal par la composition biochimique de la MEC et surtout par le fait que les populations cellulaires du stroma (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunes...), bien que non transformées, sont subverties et contrôlées par les cellules tumorales pour répondre à leurs propres besoins. En particulier, les fibroblastes peuvent être activés par des facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ , des chémokines telles que CCL2/MCP1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*) et/ou des protéases dégradant la MEC, ce qui conduit à une augmentation de leur potentiel de prolifération et à une sécrétion accrue de protéines de la MEC comme les collagènes de type I, la ténascine C et la fibronectine. Ces fibroblastes activés associés aux cancers sont appelés CAF, pour *Cancer-Associated Fibroblasts*, et peuvent soutenir la prolifération tumorale (Addadi *et al.*, 2010). En outre, la remarquable plasticité dont font preuve les macrophages leur permet de répondre efficacement aux signaux environnementaux par des changements profonds de leur phénotype et de leur physiologie. Leurs capacités de présentation antigénique et d'activation des cellules immunitaires, leurs propriétés phagocytaires et leurs propriétés dites cicatrisantes (angiogenèse et remodelage de la





**Figure 13. La contexture immunitaire.**

**a)** Anatomie de la tumeur montrant les particularités de la contexture immunitaire avec le centre de la tumeur, le front invasif, les structures lymphoïdes tertiaires adjacentes et le microenvironnement tumoral. La distribution de diverses populations cellulaires est montrée. **b)** Tableau décrivant les paramètres de la contexture immunitaire associés à un pronostic clinique favorable. CT : Centre de la Tumeur, CTLs : Cellules T Cytotoxiques, IM : Marge Invasive, MDSC : Cellules Myéloïdes Suppressives. D'après (Fridman *et al.*, 2012).

matrice extracellulaire) peuvent ainsi être aisément modulées et générer des macrophages alternatifs de type M2 protumoraux et pro-métastatiques ne présentant pas les caractéristiques d'une activation classique (Mantovani *et al.*, 2008). La production de la chémokine CCL22 par les macrophages associés aux tumeurs et/ou par les cellules cancéreuses induit le recrutement de cellules Treg immunosuppressives au sein de la tumeur (Curiel *et al.*, 2004). Enfin, un microenvironnement hypoxique confère aux cellules tumorales la capacité de contourner la surveillance immunitaire notamment en échappant à la lyse médiée par les cellules NK (Baginska *et al.*, 2013).

Les deux processus, cancérisation et perturbation du microenvironnement, sont intimement liés : l'un participant au développement et au maintien de l'autre, et réciproquement. La compréhension du microenvironnement cellulaire normal et tumoral est donc essentielle pour le développement de traitements ciblant une tumeur dans tous ses aspects : les cellules cancéreuses d'une part mais également le milieu qui leur permet de croître et de se propager *via* le recrutement d'un infiltrat cellulaire qui leur est favorable.

### 3. Environnement tumoral et évolution de la pathologie cancéreuse

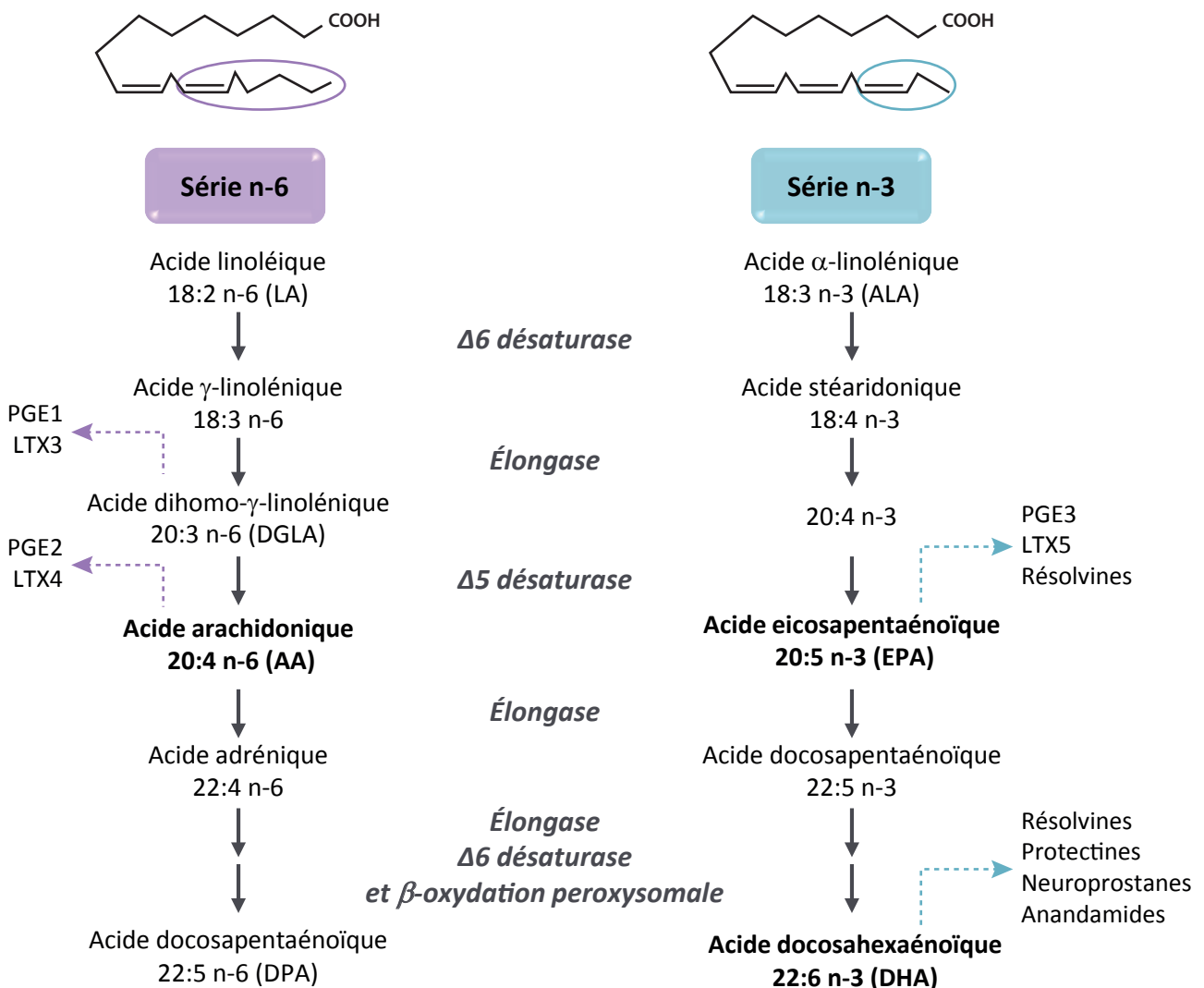
L'idée d'une surveillance immunologique des cancers est confortée par la présence d'infiltrat lymphoïde au niveau de tumeurs d'origine histologique diverse. En effet, l'augmentation de la survie globale ou de la survie sans récurrence des patients a pu être corrélée à la densité des lymphocytes infiltrant la tumeur dans certains cancers (Clark *et al.*, 1989). Outre cet aspect quantitatif, la nature de l'infiltrat lymphoïde serait également déterminante dans l'évolution de la maladie. La relation entre le stade de la tumeur et les populations lymphocytaires T intratumorales dominantes ou le ratio entre cellules répondeuses et suppressives infiltrant la tumeur, pourrait définir l'état du système immunitaire au cours du développement tumoral. Elle permettrait de discriminer un contexte immunostimulant d'un contexte immunosubversif, en d'autres termes différencier l'état d'équilibre de la phase d'échappement, à la base du concept d'immunoediting (Fridman *et al.*, 2012; Galon *et al.*, 2006). La définition récente de contexture immunitaire décrit cet état favorable ou non de l'environnement tumoral sur le développement de la tumeur (Figure 13, p. 85). La contexture immunitaire recoupe la localisation préférentielle, la densité, la nature et l'orientation fonctionnelle des cellules infiltrant les tumeurs et prédit ainsi le pronostic clinique relatif à cette analyse multifactorielle.

## 4. Le potentiel antitumoral des acides gras polyinsaturés de la série n-3

### 4.1. Constatations épidémiologiques des effets protecteurs des AGPI n-3

De par leur nature et leur abondance dans l'alimentation, les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont susceptibles d'interférer sur l'étiologie d'un grand nombre de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et inflammatoires, les neuropathologies ou encore les cancers. L'intérêt des AGPI de la série n-3 a été plus spécifiquement étudié dans la physiologie cardiovasculaire et dans l'inflammation. En effet, les propriétés bénéfiques des AGPI n-3 en nutrition humaine ont été constatées il y a une trentaine d'années à partir d'études épidémiologiques comparatives entre les Esquimaux groenlandais et les Danois. Ces observations relevaient une moindre prévalence des maladies cardiovasculaires et inflammatoires dans la population inuit, dans laquelle la consommation de graisses animales se fait exclusivement par l'apport d'animaux marins, très riches en acides gras n-3 à longue chaîne, notamment en acides eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3). En revanche, les AGPI n-6 ne partagent pas les mêmes propriétés biologiques puisqu'il a été montré qu'ils pouvaient contribuer au développement de réponses pro-inflammatoires.

L'intérêt en cancérologie pour les lipides d'origine marine s'est donc développé au cours de ces dernières années, lorsque les études épidémiologiques ont mis en évidence qu'une alimentation riche en AGPI n-3 était associée à un risque diminué de cancers du sein, du côlon et de la prostate. L'étude de l'analyse de la composition en acides gras du tissu adipeux de patientes atteintes d'un cancer du sein (reflet de la consommation passée de lipides) a montré que le DHA améliorait la réponse des tumeurs à la chimiothérapie (Bougnoux *et al.*, 1999). Différentes études précliniques menées chez le rongeur ont révélé qu'une supplémentation alimentaire en AGPI n-3 pouvait sensibiliser les tumeurs mammaires aux traitements anticancéreux. Plus récemment, deux études cliniques ont montré qu'un apport alimentaire en AGPI n-3 au cours de la chimiothérapie améliorait l'efficacité de ce traitement chez des patients atteints de cancers du sein (Bougnoux *et al.*, 2009) et du poumon (Murphy *et al.*, 2011). Les études actuelles portent tant sur la compréhension des mécanismes de sensibilisation des tumeurs par les AGPI n-3 que sur l'impact immunomodulateur de cette classe de lipides.



**Figure 14. Biosynthèse et métabolisme de base des acides gras polyinsaturés des séries n-6 et n-3.**

La biosynthèse de AGPI se fait à partir des acides gras essentiels, c'est-à-dire apportés exclusivement par l'alimentation : l'acide linoléique (18:2n-6 ou LA) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (18:3n-3 ou ALA). Le réticulum endoplasmique, site de cette biosynthèse, héberge deux systèmes enzymatiques : les élongases qui se chargent d'ajouter deux chaînons carbonés à l'acide gras et les désaturases qui insèrent les doubles liaisons. La synthèse du DHA et du DPA nécessite une étape terminale de  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes, raccourcissant de deux atomes de carbone leurs précurseurs respectifs. Le métabolisme de ces AGPI conduit à la formation de dérivés oxygénés plutôt pro-inflammatoires pour la série n-6 et, à l'inverse, anti-inflammatoires pour la série n-3. LTXn : Leucotriènes série n, PGE n : Prostanoïdes série n.

Dans la suite du manuscrit, nous détaillerons tout particulièrement l'impact des AGPI n-3 sur les populations lymphocytaires T CD4, des effecteurs capables de contribuer aux réponses anticancéreuses ou au contraire de les freiner.

#### 4.2. Structure et nomenclature des AGPI

Les AGPI se répartissent en deux familles non interconvertibles : les AGPI n-6 et n-3. Les premiers sont essentiellement retrouvés dans les viandes d'animaux terrestres ainsi que dans les huiles végétales, tandis que les huiles de poisson des mers froides constituent la source principale des seconds. Structurellement, les doubles liaisons éthyléniques disposées le long de la chaîne hydrocarbonée des AGPI sont systématiquement distantes de trois atomes de carbone et généralement en configuration *cis*. Ainsi, le terme n-3 ou n-6 ( $\omega$ 3 ou  $\omega$ 6) fait référence à la nomenclature biochimique de ce type de lipides simples et indique la position de la première insaturation à partir du méthyle terminal. Les principaux représentants des AGPI chez les mammifères sont les acides dihomog- $\gamma$ -linoléique (DGLA, 20:3 n-6) et arachidonique (AA, 20:4 n-6) pour la famille n-6, et l'EPA et le DHA pour la famille n-3.

#### 4.3. Biosynthèse et métabolisme des AGPI

La biosynthèse des AGPI n-6 et n-3 se déroule principalement dans le foie par une succession de désaturations et d'élongations localisées dans le réticulum endoplasmique (*Figure 14*, p. 88). Elle s'effectue à partir de leurs précurseurs qui sont respectivement l'acide linoléique (LA, 18:2 n-6) pour la série n-6 et l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA, 18:3 n-3) pour la série n-3. Ces AGPI sont qualifiés d'acides gras essentiels puisque l'organisme des mammifères, dépourvu de certains systèmes enzymatiques, est incapable de les synthétiser. Ces AGPI s'incorporent dans les membranes de toutes les cellules pour ensuite être libérés dans le cytoplasme après action de la phospholipase A2 (PLA2). A ce niveau, l'EPA et le DHA entrent en compétition avec l'AA pour la formation de dérivés oxygénés jouant le rôle de puissants médiateurs lipidiques : les eicosanoïdes (Calder, 2005). Selon le type de précurseurs et la voie métabolique empruntée, on distingue différentes séries d'eicosanoïdes : i) la voie des cyclooxygénases (COX) génère les prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes), ii) la voie des lipoxygénases (LOX) produit les leucotriènes et les acides gras hydroperoxylés et iii) celle des cytochromes P450 monooxygénases (CYP450) également impliquées dans la synthèse des résolvines dérivées de l'EPA et génère des acides gras hydroxylés et époxylés. Schématiquement, la série n-6 engendre plutôt des métabolites pro-inflammatoires comme

par exemple la prostaglandine E2 (Boyce, 2005) ; tandis que la série n-3 génère des dérivés tels que les résolvines et protectines participant à la résolution de l'inflammation (Spite *et al.*, 2009).

#### 4.4 Implication des AGPI dans les réponses inflammatoires

Dans l'organisme, les acides gras sont principalement stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides et constituent une source importante d'énergie. Ils sont toutefois présents dans tous les tissus où ils exercent un rôle structural en tant que constituants essentiels des membranes biologiques (sous forme de phospholipides et de glycolipides) et un rôle fonctionnel en tant que précurseurs de médiateurs lipidiques bioactifs (eicosanoïdes). Les AGPI et leurs dérivés oxygénés régulent également de multiples voies métaboliques en modulant certains processus de signalisation intracellulaire, ainsi que l'expression de gènes cibles par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que les PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) ou NF- $\kappa$ B.

La composition des lipides membranaires n'est pas figée et est directement influencée par les acides gras provenant de l'alimentation (Schley *et al.*, 2007), conditionnant la déformabilité des cellules. Un enrichissement des phospholipides membranaires en AGPI n-3 accentue la fluidité membranaire. Logés au sein des membranes cellulaires, ils modulent l'activité d'un grand nombre d'enzymes, de transporteurs, de récepteurs et de canaux ioniques impliqués dans la signalisation inter- et intracellulaire. Cet effet peut être direct *via* la constitution d'un microenvironnement peu ordonné et flexible, facilitant les changements de conformation nécessaires à l'activité de protéines intrinsèques. Ils peuvent aussi exercer leurs effets de façon indirecte en induisant la ségrégation de radeaux lipidiques ou *rafts*. Il s'agit de microdomaines membranaires dynamiques plus ordonnés, enrichis en AG saturés, glycosphingolipides et en cholestérol, auxquels sont associés des complexes protéiques souvent actifs impliqués dans les voies de signalisation (Yaqoob, 2003). L'apport alimentaire en AGPI a donc un impact sur la balance d'incorporation membranaire des dérivés lipidiques n-6 et n-3 et peut influencer sur l'incidence de pathologies cardiovasculaires et inflammatoires. En accord avec les propriétés anti-inflammatoires exercées par les AGPI n-3, la souris transgénique *fat-1*, qui synthétise les AGPI n-3 à partir de leurs homologues de la série n-6, présente une inflammation systémique réduite dans le modèle de pancréatite aiguë (Weylandt *et al.*, 2008). Enfin, les AGPI n-3 alimentaires s'avèrent protecteurs vis-à-vis de

désordres auto-immuns et inflammatoires (Camuesco *et al.*, 2005; Hudert *et al.*, 2006). À l'inverse, un enrichissement en acide arachidonique a tendance à promouvoir les désordres inflammatoires et les phénomènes allergiques. Bien que les effets bénéfiques exercés par les métabolites issus de l'EPA et du DHA soient à présent bien connus (Schwab *et al.*, 2007), leurs mécanismes d'action ne sont pas clairement élucidés, d'où l'intérêt qu'ils suscitent encore auprès de nombreuses équipes (Calder, 2006).

Les AGPI n-3 sont en outre capables d'inhiber la réponse à immunitaire innée en réduisant l'activité délétère des cellules Natural Killer lors de l'initiation de troubles auto-immuns (Lanier, 2000). Au contraire, les composés de la série n-6 n'ont aucun effet sur l'activité des cellules NK (Thies *et al.*, 2001). Enfin, les travaux de Kelley et son équipe ont révélé que les effets immunosuppresseurs obtenus avec des régimes à base d'huile de poisson étaient proportionnels à leur teneur en DHA, suggérant que le DHA représenterait la molécule active responsable des effets immunomodulateurs de ces huiles (Kelley *et al.*, 1992).

#### 4.5. Rôle nutritionnel du tissu adipeux pour le système immunitaire

Le système immunitaire interagit de façon directe avec le tissu adipeux. En effet, les ganglions lymphatiques sont intégrés dans du tissu adipeux. Chez les mammifères, les tissus adipeux péri-ganglionnaires constituent une caractéristique conservée. Ces adipocytes anatomiquement associés aux ganglions lymphatiques présentent des propriétés particulières leur permettant d'interagir localement avec les cellules lymphoïdes. Ils accumulent et stockent de façon sélective certains acides gras et notamment les AGPI, précurseurs essentiels des eicosanoïdes, les relarguant en réponse à des signaux lipolytiques locaux (Westcott *et al.*, 2005). Ces cellules adipocytaires répondent aussi beaucoup mieux que les non péri-ganglionnaires aux stimulations lipolytiques des cellules immunes (Pond and Mattacks, 1998). Les acides gras et le glycérol ainsi produits constituent donc une réserve nutritive pour les ganglions ainsi que pour les lymphocytes et cellules dendritiques qui y résident. Le contrôle paracrine de la lipolyse par les cellules lymphoïdes réduit la compétition pour l'utilisation de l'énergie avec les autres tissus (Pond, 2002). Cet approvisionnement énergétique local affranchit partiellement la fonction immune de changements quantitatifs et qualitatifs liés à l'alimentation (Knight, 2008). Enfin, les vaisseaux sanguins s'organisent en un réseau très fin autour des ganglions lymphatiques de sorte à ce que la surface de contact avec le tissu adipeux

soit optimale pour capter les produits lipolytiques libérés dans l'espace extracellulaire par les adipocytes.

#### 4.6. Impact des AGPI n-3 sur le système immunitaire adaptatif

Les AGPI n-3 revêtent un potentiel anticancéreux explicable par de nombreux mécanismes d'action. Parmi ces mécanismes, on distingue : i) des processus de sensibilisation des tumeurs par les AGPI n-3 et ii) l'influence des AGPI n-3 sur le système immunitaire adaptatif. Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet immunomodulateur du DHA, c'est pourquoi nous nous limiterons à faire l'état des lieux des connaissances en matière d'immunomodulation des populations lymphocytaires T CD4 par cette classe de lipides.

En plus de leur action sur la réponse immunitaire innée, il a été proposé que les AGPI n-3 soient également capables de moduler la réponse immunitaire adaptative. Des travaux ont montré que les AGPI n-3 orientaient la polarisation des cellules T CD4 vers le phénotype Th2 (Attakpa *et al.*, 2009), confirmant la capacité de ces composés à moduler les réponses lymphocytaires T CD4. Bien que nous ne disposions que de peu d'études relatant l'effet des AGPI n-3 sur la polarisation Th17 au moment de notre étude, des éléments suggéraient que le DHA inhibait cette différenciation (Danesi *et al.*, 2010). De plus, la littérature a rapporté que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  représentait un suppresseur intrinsèque de la différenciation Th17. Or, les AGPI sont les ligands naturels des PPAR. Les agonistes de PPAR $\gamma$  seraient capables de bloquer le signal médié par l'IL-6 en inhibant la liaison de STAT3 sur la chromatine (Klotz *et al.*, 2009). Par ailleurs, le rôle des AGPI n-3, et notamment du DHA, sur les sous-populations effectrices T CD4 restaient mal caractérisées. Notre travail a permis de mettre en évidence un lien direct entre le DHA et la réponse antitumorale (Berger *et al.*, 2013). En effet, nous avons montré que le DHA inhibait la polarisation Th17 par l'intermédiaire de PPAR $\gamma$  lui-même responsable de l'induction de SOCS3, un répresseur de STAT3. Ce mécanisme a permis d'expliquer comment en réprimant la sécrétion d'IL-17 par les cellules Th17, délétère dans certains cancers, le DHA était capable de limiter la progression tumorale. Une autre étude a conforté ces résultats et démontre que l'EPA et le DHA, seuls ou en association, affecte négativement la polarisation des cellules Th17 (Monk *et al.*, 2013). Les précurseurs T CD4<sup>+</sup> isolés de souris ayant subi un régime enrichi en AGPI n-3 et différenciées *ex vivo* en cellules Th17 produisent moins d'IL-17 et expriment moins ROR $\gamma$ t, STAT3, l'IL-6R et l'IL-23R, expliquant donc le blocage de la signalisation médiée par les cytokines impliquées dans la génération de



ces cellules. Les propriétés anti-inflammatoires des AGPI n-3 permettent donc de moduler l'ampleur des réponses Th17 impliquées dans les désordres inflammatoires. Enfin, une récente étude rapporte un rôle activateur du DHA sur la polarisation Treg dans un contexte inflammatoire (Han *et al.*, 2014). Le DHA atténue la dermatite atopique expérimentale en favorisant la polarisation de cellules T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> *in vivo* dans les ganglions drainant le territoire enflammé. Les auteurs montrent que cet effet du DHA est dépendant du TGF- $\beta$  produit notamment par les macrophages de type M2. Les macrophages M2 prétraités au DHA orientent non seulement la différenciation iTreg mais limitent aussi efficacement leurs homologues M1 pro-inflammatoires. Ces travaux font écho à un essai clinique dans lequel des patients souffrant d'eczéma atopique ayant reçu une forte dose DHA quotidiennement pendant deux mois ont vu leur condition clinique s'améliorer et amènent à une meilleure compréhension des effets anti-inflammatoires des AGPI n-3 (Koch *et al.*, 2008).

## 5. Stratégie d'immunothérapie cellulaire anticancéreuse

Au vu du peu d'efficacité des traitements conventionnels contre les cancers de stade avancé, de nombreux laboratoires ont tenté de développer des approches d'immunothérapie. Il s'agit de techniques visant la mise au point d'une vaccination antitumorale spécifique préventive ou thérapeutique capable de briser la tolérance induite par les tumeurs. Parmi les principales stratégies d'immunothérapie antitumorale on peut citer :

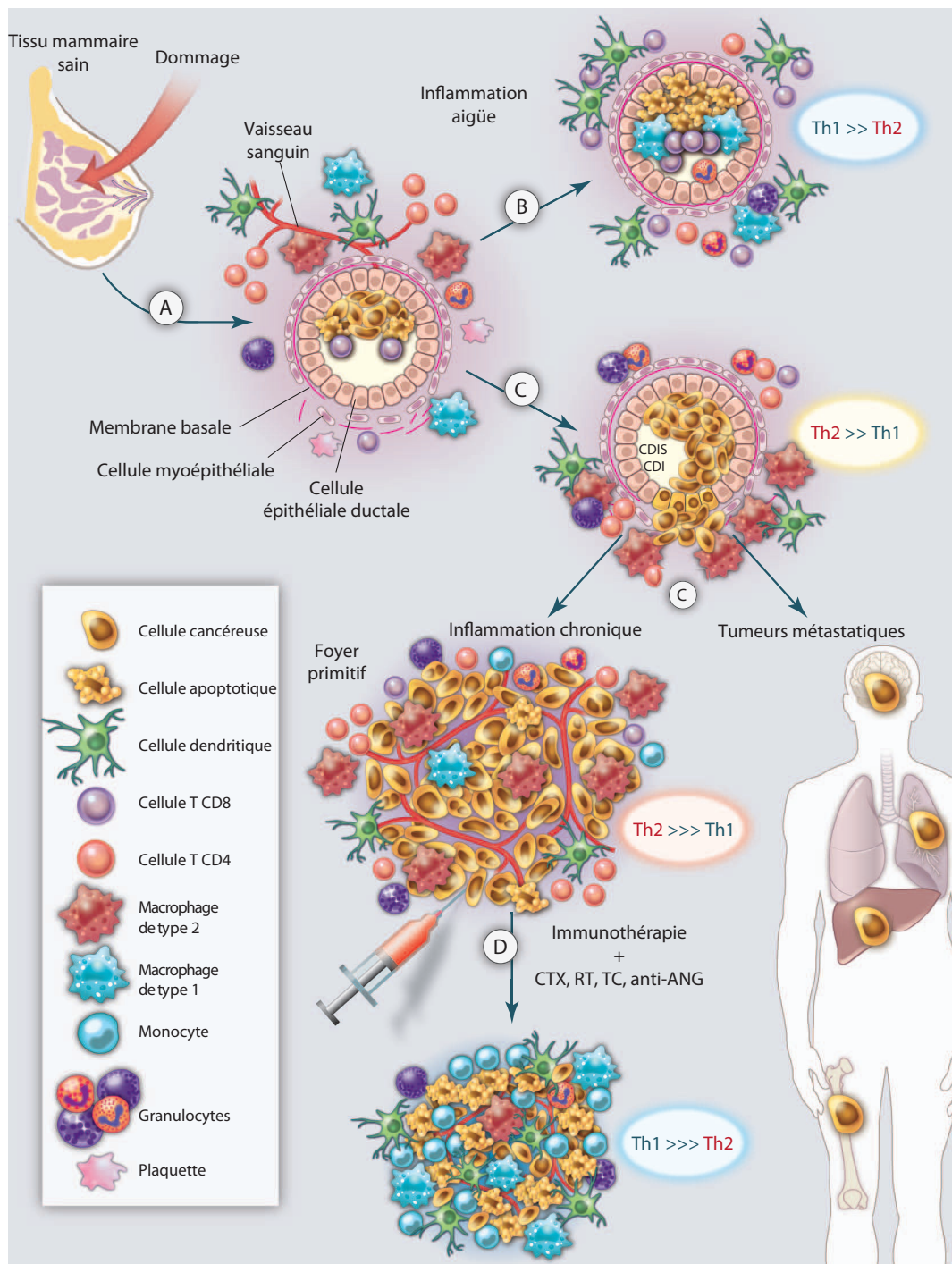
- ✓ l'immunothérapie non spécifique, fondée sur le principe d'une stimulation globale du système immunitaire notamment *via* l'injection de cytokines stimulatrices (IL-2, IFN- $\gamma$ );
- ✓ l'immunothérapie par les anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes tumoraux, focalisée sur les traitements ciblés dont les mécanismes d'action ciblent directement les cellules tumorales, inhibent les molécules pro-angiogéniques (Ac anti-VEGF ou Avastin®) ou visent à stimuler les réponses immunitaires (blocage des signaux inhibiteurs médiés par CTLA-4 ou par la voie PD-1/PD-L1 (Noman *et al.*, 2014));
- ✓ l'immunothérapie spécifique active, se basant sur des approches vaccinales de plus en plus spécifiques grâce à l'identification des antigènes tumoraux ;
- ✓ et l'immunothérapie adoptive qui consiste à infuser aux patients des effecteurs immunitaires autologues (lymphocytes T, cellules NK, monocytes). Ces cellules sont isolées à partir du sang ou de la tumeur du patient puis restimulés *in vitro* de façon plus ou moins spécifique. Les manipulations génétiques spécifiques conduisent à l'expression d'un TCR de forte affinité et spécifique d'un antigène tumoral (TCR transgénique) ou d'un récepteur

chimérique utilisant la spécificité d'un anticorps et les voies de signalisation intracellulaire d'un complexe TCR (*Chimeric Antigen Receptor* ou CAR). Les stratégies de transfert adoptif se sont développées avec l'identification de nombreux antigènes tumoraux reconnus par des lymphocytes T.

Les expériences pionnières de thérapies cellulaires par transfert adoptif d'effecteurs cytotoxiques ont été réalisées dès 1984 par l'équipe de Rosenberg qui a observé une réduction du nombre et de la taille des métastases dans plusieurs modèles de tumeurs murines après injection de lymphocytes activés (Mule *et al.*, 1984; Rosenberg *et al.*, 1986). Les souris guéries par ce traitement sont de plus immunisées contre une nouvelle greffe des cellules provenant de la tumeur d'origine, preuve d'une réponse spécifique antitumorale. Les résultats observés sur les tumeurs murines ayant été confirmés par plusieurs équipes, des essais cliniques ont été envisagés notamment dans le traitement du mélanome (Rosenberg *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 1994). Dans l'une de ces études, les lymphocytes infiltrant les tumeurs sont prélevés à partir de mélanomes et mis en culture avec de fortes doses d'IL-2 de manière à lever l'état d'anergie induit par l'environnement tumoral. Avant réinjection, une déplétion lymphocytaire sévère est induite chez les patients par un protocole combinant la fludarabine et le cyclophosphamide. Rétrospectivement, les études réalisées indiquent que l'association des lymphocytes infiltrant la tumeur avec de l'IL-2 favoriserait les réponses cliniques et que l'immunodéplétion préalable accroît la survie des patients et l'efficacité des lymphocytes injectés (Dudley *et al.*, 2005). Malgré ces résultats, le transfert adoptif reste expérimentalement lourd. Sa difficulté majeure réside dans le fait qu'il est difficile d'amplifier un nombre suffisant de cellules T fonctionnelles spécifiques d'un antigène déterminé dotées de propriétés de survie appropriées. Il est donc nécessaire d'optimiser les protocoles d'immunothérapie cellulaire pour améliorer l'efficacité de cette approche thérapeutique.

Outre l'administration de lymphocytes T infiltrant la tumeur, les essais s'orientent actuellement vers l'administration de clones T CD8 cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux (TAA). Cette méthode repose nécessairement sur plusieurs étapes *in vitro* afin d'isoler ces lymphocytes : stimulation, clonage et amplification. Un inconvénient majeur de cette stratégie est qu'elle peut provoquer la perte d'expression de l'antigène ciblé par les cellules tumorales par pression sélective. Un autre facteur limitant réside dans la nécessité de réaliser plusieurs étapes de sélection et d'amplification *in vitro* pour obtenir une grande

quantité de lymphocytes T fortement réactifs à la tumeur, ce qui conduit à l'utilisation de cellules fortement différenciées, ayant une durée de vie limitée après transfert *in vivo*. De récents progrès ont été réalisés pour dépasser ces limites et les lymphocytes T peuvent être génétiquement modifiés pour exprimer soit un TCR de forte affinité et spécifique d'un antigène tumoral, soit un récepteur antigénique chimérique (*Chimeric Antigen Receptor* ou CAR) (Jensen and Riddell, 2015). Les CAR, encore appelés T-bodies, sont généralement composés de la partie hypervariable d'un anticorps spécifique de TAA (*single-chain variable Fragment* ou scFv, chaînes lourde et légère) couplée à des domaines intracellulaires des adaptateurs transduisant le signal du TCR (Jena *et al.*, 2010). Nous avons précédemment discuté du fait que la perte d'expression des molécules CMH-I par les cellules tumorales les rend difficilement détectables par les cellules T CD8 et NK. Or, les CAR ne présentent pas de restriction au CMH et ne requièrent donc pas de présentation de ces molécules pour transmettre le signal de cytotoxicité ou d'activation. Les CAR offrent ainsi une alternative à la thérapie génique modifiant le TCR dont le CMH est nécessairement restreint aux molécules de classe I ou II pour une reconnaissance opérée respectivement soit par les cellules T CD8 soit T CD4. Par ailleurs, la réaction anticorps/antigène est plus forte que la liaison CMH/peptide. Armer les effecteurs T CD4 ou CD8 de récepteurs artificiels par ingénierie génétique conduit ainsi à reprogrammer ces cellules spécifiquement contre les antigènes associés à la tumeur pour induire les événements de signalisation ciblant la lyse tumorale. Un avantage de cette approche est qu'elle permet de transférer au patient des lymphocytes moins différenciés et donc avec un meilleur potentiel de survie *in vivo*. Cette voie très prometteuse est applicable à de nombreux cancers (Duong *et al.*, 2015), notamment aux cancers hématologiques (Grupp *et al.*, 2013; Porter *et al.*, 2011); la seule limite reste l'identification d'antigènes immunogènes. Enfin, le conditionnement préalable du patient à un traitement lymphoablatif a conduit à une nette amélioration des résultats cliniques obtenus par transfert adoptif de lymphocytes antitumoraux. Ce conditionnement est obtenu par chimiothérapie ou irradiation corporelle totale. D'une part, il induit chez le receveur une leuco-lymphopénie permettant une meilleure expansion des lymphocytes T injectés et peut, d'autre part, éliminer les cellules immunosuppressives telles que les lymphocytes T régulateurs et les cellules myéloïdes suppressives.



**Figure 15. Le ciblage de l'inflammation chronique comme stratégie thérapeutique antitumorale.**

A) Les dommages tissulaires conduisent à l'activation de voies (angiogenèse et système immunitaire) profondément ancrées dans tous les tissus pour en faciliter la réparation et maintenir l'homéostasie. B) Les réponses de type Th1 éliminent les cellules endommagées pour soutenir le processus de guérison. C) Des tissus abritant les cellules initialement lésées, les cellules endothéliales néoplasiques sécrètent de facteurs comme la TSLP (Thymic Stromal LymphoPoietin) et le TNF-α et conduisent ainsi au recrutement de lymphocytes dont la polarisation est déviée vers le sous-type Th2. Cette réponse Th2 est pro-tumorigène et engendre l'activation chronique de l'angiogenèse, augmente les signaux de survie et bloque la mort cellulaire et génère un environnement immunosuppresseur qui promeut le développement de la tumeur primaire et encourage sa dissémination métastatique. D) La réinitialisation ou la reprogrammation des réponses Th2 délétères dans un contexte tumoral vers un phénotype Th1 parviendrait à neutraliser les réponses inflammatoires chroniques et à accroître simultanément la mort immunogène des cellules tumorales, aboutissant au rejet de la tumeur. Combiner cette stratégie avec les approches thérapeutiques conventionnelles permettrait de réactiver les réponses immunes anticancéreuses. CTX : chimiothérapie, RT : radiothérapie, TC : thérapies ciblées, anti-ANG : modalités anti-angiogéniques. D'après (Coussens *et al.*, 2013).

Les cancers ont longtemps été considérés comme des pathologies de tissus ou d'organes dont l'initiation et l'évolution dépendaient uniquement de l'acquisition d'anomalies génétiques et épigénétiques par les cellules affectées. Les travaux réalisés au cours de la dernière décennie ont démontré qu'il s'agissait d'une vision restrictive et amènent à reconsidérer cette pathologie pour la concevoir également comme une maladie de l'hôte. Les interactions complexes entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement ont permis de mettre en évidence les mécanismes d'immunosuppression liés au développement des tumeurs. La conception de nouvelles thérapies doit donc prendre en compte ce dernier niveau de complexité. Lever cet état d'immunosuppression locale dans le microenvironnement contribuerait à restaurer l'efficacité des défenses antitumorales. D'autre part, l'infiltration de certaines tumeurs par des cellules lymphoïdes telles que les lymphocytes T est considérée comme le signe d'un pronostic favorable. La recherche de nouvelles thérapies induisant ou réactivant une réponse immunitaire ciblée est donc d'un intérêt majeur. Enfin, les efforts en la matière doivent converger vers la mise en place de nouvelles applications cliniques en immunothérapie anticancéreuse basées simultanément sur la réactivation des lymphocytes T et l'inhibition de l'immunosuppression associée au cancer (*Figure 15, p. 96*).

## IV. Objectifs du travail de thèse

Notre travail de recherche a pour objectif de mieux caractériser les liens entre réponse immunitaire et cancer. Les résultats obtenus dans l'équipe du Pr Ghiringhelli ont en effet souligné le rôle majeur joué par le système immunitaire dans l'effet thérapeutique des traitements des pathologies tumorales comme la chimiothérapie (Bruchard *et al.*, 2013; Vincent *et al.*, 2010). D'autre part, un autre axe développé dans l'équipe consiste en l'étude de l'implication des lymphocytes T CD4 dans les réponses immunitaires anticancéreuses. C'est précisément dans ce domaine que s'inscrit mon travail de thèse dont le but est de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des sous-types T CD4 ainsi que le rôle de ces cellules dans l'immunité antitumorale.

L'objectif du premier travail a été de déchiffrer les mécanismes impliqués dans l'immunomodulation médiée par le DHA, un lipide de la classe des acides gras polyinsaturés de la série n-3 connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Nos observations préliminaires indiquaient un effet antitumoral du DHA dans des modèles expérimentaux murins. La caractérisation des mécanismes moléculaires médiés par le DHA a permis d'identifier la population lymphocytaire Th17 comme cible des effets immunomodulateurs du DHA. Le DHA réprime la génération de cellules Th17. Les Th17 étant impliqués dans la promotion de certains cancers, nous avons ainsi identifié l'un des mécanismes d'action du DHA expliquant son potentiel anticancéreux. Cette première étude montre comment restaurer une réponse antitumorale efficace en ciblant une population effectrice délétère dans certains cancers.

Le projet suivant a eu pour but de potentialiser les propriétés effectrices des cellules Th9 pour contribuer plus efficacement à la lutte antitumorale. Pour cela, nous avons mené une étude approfondie des événements moléculaires sous-jacents à la différenciation de ces cellules en présence ou non d'interleukine 1 $\beta$  et avons mis au jour l'implication du facteur de transcription IRF1. L'étude de la régulation transcriptionnelle d'IRF1 sur le programme Th9 a permis d'établir le fait qu'il contrôlait les propriétés antitumorales de ces cellules. Ici, nous démontrons comment optimiser les réponses antitumorales en renforçant les propriétés effectrices de cellules T CD4 initialement décrites comme bonnes candidates pour limiter le développement tumoral.

Enfin, les recherches menées actuellement se concentrent sur l'étude de la biologie des cellules TFh dans un contexte de cancer. La présence de cellules TFh infiltrant les tumeurs a été récemment associée à un meilleur pronostic chez des patients atteints de cancer du sein ou du côlon. Mais, les événements moléculaires engagés au cours de la génération de TFh et leur rôle mécanistique restent encore à éclaircir. L'objectif de ce projet est donc d'investiguer le rôle des cellules TFh dans des modèles de cancers murins afin de mieux définir la biologie de ce sous-type cellulaire. Pour ce faire, nous avons employé les stratégies suivantes : 1) l'étude de la polarisation *ex vivo* de cellules TFh à partir de lymphocytes T CD4 naïfs mis en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (engageant l'activation du lymphocyte T) et d'IL-6 ; 2) l'induction de TFh *in vivo* après stratégie vaccinale ; 3) l'utilisation de modèles de tumeurs murines transplantables pour lesquelles nous avons observé une accumulation de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> dans les ganglions drainant les tumeurs implantées (modèles de mélanome B16F10 et de cancer bronchique Lewis Lung Carcinoma LLC). La caractérisation des événements moléculaires édictés au cours de la polarisation TFh nous permettra d'envisager leur utilisation potentielle en immunothérapie antitumorale.

## **RÉSULTATS**



## I. Article 1

« SOCS3 transactivation by PPAR $\gamma$  prevents IL-17-driven cancer growth. »

Un premier travail, initié lors de mon stage de Master 2 Recherche, a consisté en l'étude de l'acide docosahexaénoïque (acide gras à longue chaîne de la série n-3) sur la différenciation lymphocytaire Th17. Les recherches relatives à ce projet, amorcées en 2011, ont abouti à la publication d'un article scientifique en juin 2013 dans le journal *Cancer Research*. Hormis les techniques visant à déterminer la composition en acides gras dans les tissus, mon implication dans ce projet a été entière. Mon travail a consisté à réaliser l'ensemble des expérimentations présentées dans l'article, tant *in vitro* qu'*in vivo*, grâce à l'encadrement du Dr Végran.

Ces travaux mettent en évidence le mécanisme moléculaire responsable de l'inhibition directe de la polarisation cellulaire Th17 par le DHA. Nous avons observé une diminution de la sécrétion d'IL-17 et de l'expression de ROR $\gamma$ t dans les cellules T CD4 différenciées *in vitro* en présence de DHA alors que d'autres acides gras polyinsaturés (EPA, 20:5 n-3 ou AA, 20:4 n-6) n'ont pas d'effet sur la polarisation Th17 (Figures 2A-D). De même, la différenciation Th17 de lymphocytes T CD4 naïfs isolés de souris C57BL/6 ayant subi un régime enrichi en DHA est également abolie (Figures 1B-D). De façon intéressante, les autres sous-types T CD4 ne sont pas affectés par le DHA et aucune transdifférenciation n'est observée (Figures 1A, C-D ; 2E).

Au niveau moléculaire, nous montrons que le DHA active le facteur de transcription PPAR $\gamma$  dans les cellules en différenciation mais pas le récepteur GPR120 (Figures 4A-B). Ces résultats ont été reproduits par des agonistes synthétiques de PPAR $\gamma$  et l'utilisation d'un siRNA dirigé contre PPAR $\gamma$  a validé l'effet du DHA sur la différenciation Th17 (Figures 4C-D). Nous avons finalement confirmé le rôle de PPAR $\gamma$  après avoir différencié des cellules T CD4 naïves isolées de souris PPAR $\gamma$ <sup>-/-</sup> et observé que le DHA n'affectait plus la polarisation Th17 dans ce cas (Figure 4F). Une fois activé, PPAR $\gamma$  se fixe sur le promoteur de SOCS3 et induit son expression (Figures 4E). SOCS3 inhibe la phosphorylation de STAT3 qui est un événement indispensable à l'initiation de la polarisation cellulaire Th17 (Figures 3A-B). SOCS3 agit alors comme un répresseur intrinsèque de la différenciation Th17 et inhibe l'expression de ROR $\gamma$ t et d'IL-17 dans ces cellules (Figures 3C-D).

Nous avons également montré que l'activité anticancéreuse du DHA était dépendante de sa capacité à inhiber la sécrétion d'IL-17 par les cellules T CD4 *in vivo*. Dans deux modèles de cancers murins (mélanome B16F10 et adénocarcinome mammaire 4T1), nous avons observé un retard de croissance tumorale chez les souris pour lesquelles le régime est supplémenté en DHA (Figures 5B-C). Cet effet est aboli chez les souris *Il17a<sup>-/-</sup>* ou lorsqu'un schéma de déplétion de l'IL-17 est appliqué (Figures 5C-D). Par ailleurs, nous avons démontré que l'effet antitumoral du DHA était dépendant de sa capacité à inhiber la sécrétion d'IL-17 par les cellules Th17 et non par les cellules T $\gamma\delta$  (Figures 6A-C). Enfin, en limitant la production d'IL-17, le DHA prévient la néoangiogenèse de la tumeur au même titre qu'un anticorps bloquant le récepteur au VEGF (Figures 6D-E).

## SOCS3 Transactivation by PPAR $\gamma$ Prevents IL-17–Driven Cancer Growth

Hélène Berger<sup>1,2</sup>, Frédérique Végran<sup>1,2</sup>, Madijd Chikh<sup>1,2</sup>, Federica Gilardi<sup>5</sup>, Sylvain Ladoire<sup>1,2,3</sup>, Hélène Bugaut<sup>1,2</sup>, Grégoire Mignot<sup>1,2</sup>, Fanny Chalmin<sup>1,2</sup>, Mélanie Bruchard<sup>1,2</sup>, Valentin Derangère<sup>1,2</sup>, Angélique Cheviaux<sup>1,2,3</sup>, Cédric Rébé<sup>1,2,3</sup>, Bernhard Ryffel<sup>4,8</sup>, Caroline Pot<sup>6,7</sup>, Aziz Hichami<sup>1,2</sup>, Béatrice Desvergne<sup>5</sup>, François Ghiringhelli<sup>1,2,3</sup>, and Lionel Apetoh<sup>1,2,3</sup>

### Abstract

Activation of the transcription factor PPAR $\gamma$  by the n-3 fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) is implicated in controlling proinflammatory cytokine secretion, but the intracellular signaling pathways engaged by PPAR $\gamma$  are incompletely characterized. Here, we identify the adapter-encoding gene *SOCS3* as a critical transcriptional target of PPAR $\gamma$ . *SOCS3* promoter binding and gene transactivation by PPAR $\gamma$  was associated with a repression in differentiation of proinflammatory T-helper (T<sub>H</sub>)17 cells. Accordingly, T<sub>H</sub>17 cells induced *in vitro* displayed increased *SOCS3* expression and diminished capacity to produce interleukin (IL)-17 following activation of PPAR $\gamma$  by DHA. Furthermore, naïve CD4 T cells derived from mice fed a DHA-enriched diet displayed less capability to differentiate into T<sub>H</sub>17 cells. In two different mouse models of cancer, DHA prevented tumor outgrowth and angiogenesis in an IL-17–dependent manner. Altogether, our results uncover a novel molecular pathway by which PPAR $\gamma$ -induced *SOCS3* expression prevents IL-17–mediated cancer growth. *Cancer Res*; 73(12): 1–13. ©2013 AACR.

### Introduction

Inflammation plays contrasting roles during cancer progression. Acute inflammation can be beneficial for cancer regression as shown by the requirement of HMGB1 and interleukin (IL)-1 $\beta$  for the induction of CD8 T-cell polarization and anticancer immune responses (1, 2). In contrast, proinflammatory mediators can support growth of established cancers by supporting an inflammatory milieu within the tumor microenvironment that favors tumor cell survival and neoangiogenesis (3). IL-17–producing CD4 T cells [T-helper (T<sub>H</sub>)17 cells] have recently emerged as a key T-cell subset that produces proinflammatory mediators such as IL-17A, IL-17F,

IL-21, and TNF- $\alpha$  and promotes autoimmunity (4). T<sub>H</sub>17 cells can be induced from naïve T cells using stimulation with TGF- $\beta$  and IL-6 and are characterized by the expression of their lineage-specific transcription factor ROR $\gamma$ t (5). Although *Rorc* is indispensable for T<sub>H</sub>17 cell induction, STAT3 is also an essential transcription factor for T<sub>H</sub>17 cell differentiation as it directly regulates *il17a/f* and *Rorc* gene transcription (6, 7). IL-17 secretion from T<sub>H</sub>17 cells has been proposed to contribute to tumor progression through the promotion of tumor neoangiogenesis (8).

The beneficial anti-inflammatory properties of dietary intake of (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) were initially illustrated by epidemiologic studies reporting a lower incidence of cardiovascular diseases in Eskimos compared with Western populations (9, 10). Administration of the n-3 PUFA docosahexaenoic acid (DHA) was later shown to dampen proinflammatory mediator secretion in patients with cancer (11). Activation of the transcription factor PPAR $\gamma$  has been proposed to account for the ability of DHA to prevent proinflammatory cytokine release (12).

Although DHA anticancer efficacy has been reported in preclinical mouse models of established tumors (13), whether the anticancer activity of DHA relies on its ability to modulate the production of proinflammatory cytokines remains elusive. Here, we report that activation of the PPAR $\gamma$  transcription factor by DHA in developing T<sub>H</sub>17 cells induces *Socs3* expression and interferes with the STAT3 signaling pathway, thereby inhibiting T<sub>H</sub>17 cell differentiation. In addition, DHA prevents *in vivo* tumor growth of B16F10 melanoma and 4T1 mammary adenocarcinoma tumors in an IL-17–dependent manner. Altogether, not only our study shows that DHA administration prevents tumor angiogenesis and growth in an IL-17–

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U866; <sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université de Bourgogne; <sup>3</sup>Centre Georges François Leclerc, Dijon; <sup>4</sup>University and CNRS, UMR7355, Orléans, France; <sup>5</sup>Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Lausanne; <sup>6</sup>Division of Neurology, Geneva University Hospital; <sup>7</sup>Department of Pathology and Immunology, University of Geneva, Geneva, Switzerland; and <sup>8</sup>Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine (IIDMM), University of Cape Town, Cape Town, Republic of South Africa

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

H. Berger and F. Végran share first co-authorship of this article.

F. Ghiringhelli and L. Apetoh share senior co-authorship of this article.

**Corresponding Authors:** François Ghiringhelli, Centre de Recherche, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U866, Facultés de Médecine et de Pharmacie, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France. Phone: 33-3-80-39-33-53; Fax: 33-3-80-39-34-34; E-mail: fgiringhelli@cgfl.fr; and Lionel Apetoh, lionel.apetoh@inserm.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4018

©2013 American Association for Cancer Research.

dependent manner, but it also uncovers a previously unrecognized molecular pathway by which PPAR $\gamma$ -induced SOCS3 expression in T<sub>H</sub>17 cells prevents IL-17 secretion.

## Materials and Methods

### Mouse strains

All animals were bred and maintained according to both the Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, Dijon, France). Animals were used between 6 and 22 weeks of age. Female C57BL/6, BALB/c and Nude mice were purchased from Centre d'élevage Janvier and from Charles River Laboratories. ROR $\gamma$ t-eGFP reporter mice were obtained from Dr. Eberl (Institut Pasteur, Paris, France) and have been previously described (14). *IL-17a*<sup>-/-</sup> mice were obtained from Dr. Y. Iwakura (University of Tokyo, Tokyo, Japan; ref. 15).  $\gamma\delta$ TCR-deficient mice were kindly provided by Dr. Bernhard Ryffel (University and CNRS, Orléans, France). Rag2<sup>-/-</sup> mice were provided by the CDTA (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal) and distributed by EMMA (European Mouse Mutant Archive, a service funded by the EC FP7 Capacities Specific Programme). PPAR $\beta$ - and PPAR $\gamma$ -deficient mice were provided by Pr. Béatrice Desvergne (Centre for Integrative Genomics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland) and have been described previously (16, 17).

### Diets

To investigate the effect of dietary DHA in mice, we constituted 2 diet groups. One was fed a control diet containing sunflower oil, and the other group of mice was fed a DHA-enriched diet containing Omegavie DHA90 TG (Polaris Nutritional Lipids) for at least 3 weeks before starting experiments. Diets were prepared as described by Triboulot and colleagues (Supplementary Fig. S1; ref. 18).

To investigate the effect of dietary DHA in 2 human healthy volunteers (2 of the authors), 860 mg/day of DHA (Nutrixeal) was provided as a diet supplement for 3 weeks. Naïve CD4 T-cell differentiation into T<sub>H</sub>17 cells was then assessed.

### Fatty acid analysis

Total lipids were extracted from the diets according to the method of Bligh and Dyer (19), then transmethylated by BF<sub>3</sub>/methanol after saponification and fatty acids were analyzed by gas-liquid chromatography using C<sub>15:0</sub> as internal standard with a Becker gas chromatograph (Becker Instruments) equipped with a 50 m capillary glass column packed with carbowax 20 m (Spiral-RD) as described previously (18).

Direct quantification of nonesterified fatty acid in plasma was conducted by a one-step method of derivatization and extraction using (trimethylsilyl)diazomethane (Sigma) in the presence of C<sub>15:0</sub> as internal standard (20) with subsequent analysis by conventional gas-liquid chromatography as described earlier.

### Tumor growth experiments

B16F10 melanoma and 4T1 mammary adenocarcinoma cancer cells were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-

1640 with GlutaMax-1 (Lonza) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Lonza), 1% penicillin, streptomycin, amphotericin B (Gibco), 4 mmol/L HEPES (Gibco), and 1 mmol/L sodium pyruvate (Gibco). 4T1 cells were kindly provided by Dr. Trad (Université de Bourgogne, Dijon, France) and B16F10 cells were obtained from American Type Culture Collection. All cells were routinely tested for *Mycoplasma* contamination using Mycoalert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) and found negative. To induce tumor formation, 3 × 10<sup>5</sup> B16F10 or 10<sup>5</sup> 4T1 cancer cells were injected subcutaneously into Nude or immunocompetent mice. *In vivo* IL-6 and IL-17 neutralization were respectively achieved by injecting 200 μg intraperitoneally (i.p.) of an anti-IL-6 (clone MP5-20F3; BioXCell) or an anti-IL-17 antibody (clone 17F3; BioXCell) on day 0, 1, 2, 3, 4, and 6 following tumor implantation. *In vivo* IL-1 blockade was carried out by injecting i.p. 30 μg of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra; Kineret from Biovitrum) 3 times a week. All experiments were carried out in accordance with guidelines prescribed by the Ethics Committee at the University of Burgundy.

### CD31 immunostaining

Tumors were cryosliced from mouse biopsies and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Sections were probed with a rat monoclonal against CD31 (BD Biosciences—Pharmingen) followed by a secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP) and counterstained with Harris's hematoxylin.

### *In vitro* T-cell differentiation

Naïve CD4<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup>) were obtained from spleens and lymph nodes of C57BL/6 wild-type (WT) or PPAR $\beta$ - or PPAR $\gamma$ -deficient mice. CD4<sup>+</sup> T cells were purified from spleen and lymph nodes with anti-CD4 microbeads (Miltenyi Biotec), then were further sorted as naïve CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup> T cells. Isolated naïve T cells were routinely 98% pure. Isolated naïve CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with plate-bound antibodies against CD3 (145-2C11, 2 μg/mL; BioXCell) and CD28 (PV-1, 2 μg/mL; BioXCell) and polarized into effector CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets with cytokines in presence or not of DHA (Sigma-Aldrich). Mouse IL-4 (20 ng/mL), IL-6 (25 ng/mL), IL-12 (10 ng/mL), and TGF- $\beta$  (2 ng/mL) were all purchased from MiltenyiBiotec. Anti-IL-4 (clone 11B11) and anti-IFN- $\gamma$  (clone XMG1.2; 10 μg/mL) antibodies were obtained from Bio-XCell. In some experiments, the PPAR $\gamma$  agonist troglitazone and the antagonist GW9662 have been added at final concentrations of 0.75 and 0.1 μmol/L, respectively (Cayman Chemical). The PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  antagonists (GW6471 and GSK0660; Sigma-Aldrich) have been supplemented to reach a final concentration of 0.24 and 0.16 μmol/L, respectively. Cells were classically harvested on day 3 (unless otherwise specified) for detection of cytokines by ELISA and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis.

Experiments on human CD4<sup>+</sup> T cells were carried out using peripheral blood from healthy volunteers (provided by the "Etablissement Français du Sang" Besançon, France). Written informed consent was obtained from all healthy blood donors. Naïve CD4<sup>+</sup> T cells were isolated with the human CD4<sup>+</sup> T Cell

Isolation Kit II (MiltenyiBiotec), followed by stimulation with the Expansion/Activation Kit (MiltenyiBiotec), and differentiated for 3 days into T<sub>H</sub>0 cells without cytokines or T<sub>H</sub>17 cells in presence of TGF- $\beta$  (2 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL), and IL-23 (10 ng/mL).

#### siRNA transfection

For transfection experiments, naïve CD4<sup>+</sup> T cells were transfected *in vitro* with Silencer Select Predesigned siRNA specific for murine *SOCS3* (ID: s72013; Ambion, Life Technologies) or murine *PPAR $\gamma$*  (ID: 160219; Ambion) or Silencer Negative Control N°1 (Ambion) with transfection reagent *TransIT-TKO* (Mirus Bio LLC) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours after transfection, CD4<sup>+</sup> T cells were restimulated with anti-CD3 and anti-CD28, differentiated in T<sub>H</sub>0 or T<sub>H</sub>17 conditions as described earlier and cultured for an additional 24 or 48 hours before analysis.

#### Measurement of cytokines

After 72-hour polarization, cell culture supernatants were assayed by ELISA for mouse IL-4 (BD Biosciences), IL-17a (Biolegend), IFN- $\gamma$  (BD Biosciences), or human IL-17 (Biolegend) according to the manufacturer's protocol.

For intracellular cytokine staining, cells were cultured for 5 days and then stimulated for 4 hours at 37°C in culture medium containing phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 50 ng/mL; Sigma-Aldrich), ionomycin (1  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich), and monensin (GolgiStop; 1  $\mu$ L/mL; BD Biosciences). After staining for surface markers and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) to exclude dead cells, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Cytofix/Cytoperm Kit; BD Biosciences), then stained for intracellular products. Monoclonal antibodies (mAb) used for flow cytometry analyses were as follows: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD4 (GK1.5; BD Biosciences), Alexa Fluor 647-conjugated anti-IL-17 (eBio 17B7; eBiosciences), and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-IL-4 (554435; BD Biosciences) or PE-conjugated anti-IFN- $\gamma$  (554412; BD Biosciences).

All events were acquired by a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

#### Immunoblot analysis

Purified naïve T cells were differentiated for 24 to 48 hours into T<sub>H</sub>0 or T<sub>H</sub>17 cells with or without DHA (20  $\mu$ mol/L), then collected and pelleted by centrifugation (5 minutes, 1,500  $\times$  g). Cells were lysed in boiling buffer [1% SDS, 1 mmol/L sodium orthovanadate, and 10 mmol/L Tris (pH 7.4)] containing protease inhibitor cocktail for 20 minutes at 4°C. Cell lysates were subjected to sonication (10 seconds at 10%) and protein concentration was assessed using the Bio-Rad DC Protein Assay Kit. Proteins were then denatured, loaded, and separated on SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell). After blocking with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-0.1% Tween 20 (TBST), membranes were incubated overnight with primary antibody diluted in TBST containing 1% BSA, washed and incubated

for 1 hour with secondary antibody diluted in TBST-1% BSA. After additional washes, membranes were incubated with luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology) and exposed to X-ray films. The following mouse mAbs were used: anti-STAT3 (Cell Signaling Technology), anti-SOCS3 (Novus Biologicals), and anti- $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich). The following rabbit polyclonal antibody was used: anti-phospho-STAT3-Tyr705 (Cell Signaling Technology). Secondary antibodies HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch) and polyclonal rabbit anti-goat immunoglobulins (Dako) were also used.

#### Chromatin immunoprecipitation assay

Cells were differentiated for 24 hours into T<sub>H</sub>17 cells with or without DHA. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was conducted according to the manufacturer's instructions (ChIP-IT Express Enzymatic; Active Motif). Briefly, cells were fixed in a solution containing 37% formaldehyde for 10 minutes and quenched with 0.125 mol/L glycine. Chromatin was isolated and sheared to an average length of 300 to 500 bp by Enzymatic Cocktail. Twenty-five micrograms of DNA were immunoprecipitated with a PPAR $\gamma$ -specific antibody (H-1000; Santa Cruz Biotechnology). After chromatin elution, cross-links were reversed by a Reverse Cross-linking Buffer and qRT-PCR was conducted. Data were normalized to *Actin-b* C<sub>t</sub> values and expressed in fold enrichment according to immunoglobulin (Ig) values. Primers designed to assess ChIP assay are as follows: *Actb* 5'-actctttgacccacattcc-3' and 3'-agcgtctggttcccaact-5'; *Socs3* 1679 5'-gtcgacattcctctcagttt-3' and 5'-gcacccttccttttcttt-3'; and *Socs3* 576 5'-cccaggtccttg-cctgatt-3' and 5'-tgagagaggggaccaggagaaa-3'.

#### Quantitative real-time PCR

Total RNA from T cells was extracted with TriReagent (Ambion), reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), and was analyzed by qRT-PCR with the SYBR Green method according to the manufacturer's instructions using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Expression was normalized to the expression of mouse *Actb*. Primers designed to assess gene expression are as follows: *Actb* 5'-atggagggaatacacccc-3' and 5'-ttctttgacgtcctcctt-3'; *Tbx21* 5'-atcctgtaatggcttgagg-3' and 5'-tcaaccagcaccagacagag-3'; *Gata-3* 5'-aggatgtccctgctcctt-3' and 5'-gcctgctgactctaccataa-3'; *Foxp3* 5'-ctcgtctgaaggcagagtca-3' and 5'-tggcagagaggtattgagg-3'; *Rorc mus musculus* 5'-ggtgataacccctagtgga-3' and 5'-ctgcaagaagaccacacc-3'; *Rora* 5'-cccctactgtccttaccaca-3' and 5'-tgccacatcactctctctg-3'; *Ahr* 5'-ctccttctgcaaatcctgc-3' and 5'-ggccaagagcttcttgatg-3'; *il17f* 5'-ttgatgacgtcgtgct-3' and aattccagaaccgctccagt-3'; *il21* 5'-aaaacaggcaaaagctgcat-3' and 5'-tgacattgtgacagctgaaa-3'; *il22* 5'-tcgcttgatctctcactc-3' and gctcagctcctgtcacatca-3'; *cd4* 5'-cctgtgcaagaagcagagt-3' and 3'-gttctgctgattccccttcc-5'; *Tgfb1* 5'-caaccaggtccttctctaaa-3' and 3'-ggagagccctggatacaac-5'; *Rorc homo sapiens* 5'-aagcaggagcaatggaagt-3' and 3'-gcaatctcactcctcgaaaa-5'; *Socs3 mus musculus* 5'-aactgtct-gtgggtgaccat-3' and 5'-aaggccggagatttctgct-3'; *Socs3 homo sapiens* 5'-tggatggagcggaggct-3' and 5'-acgggacatcttcac-cacagctcct-3'; *gpr120* 5'-gatttctctatcggttgg-3' and 5'-

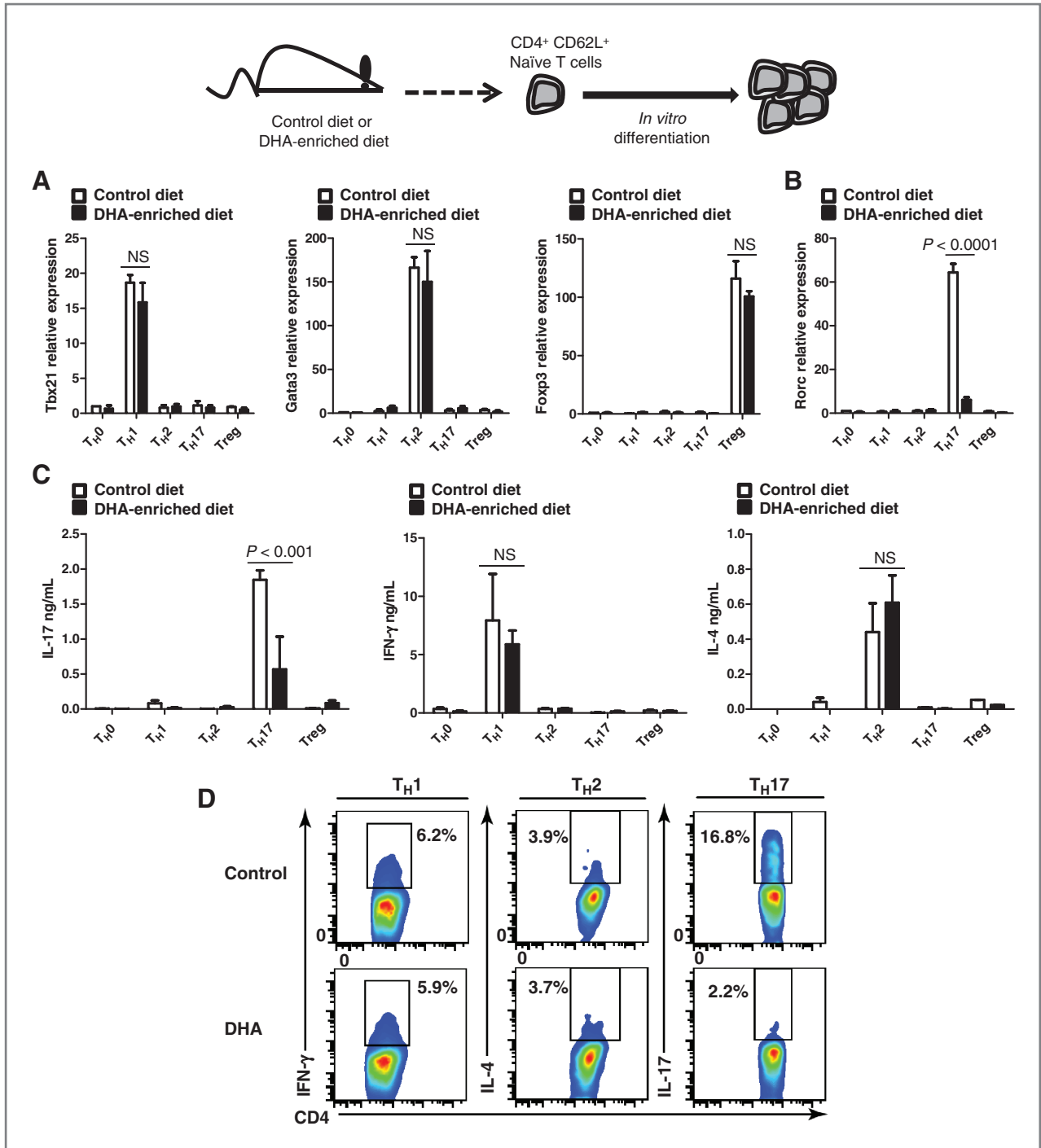
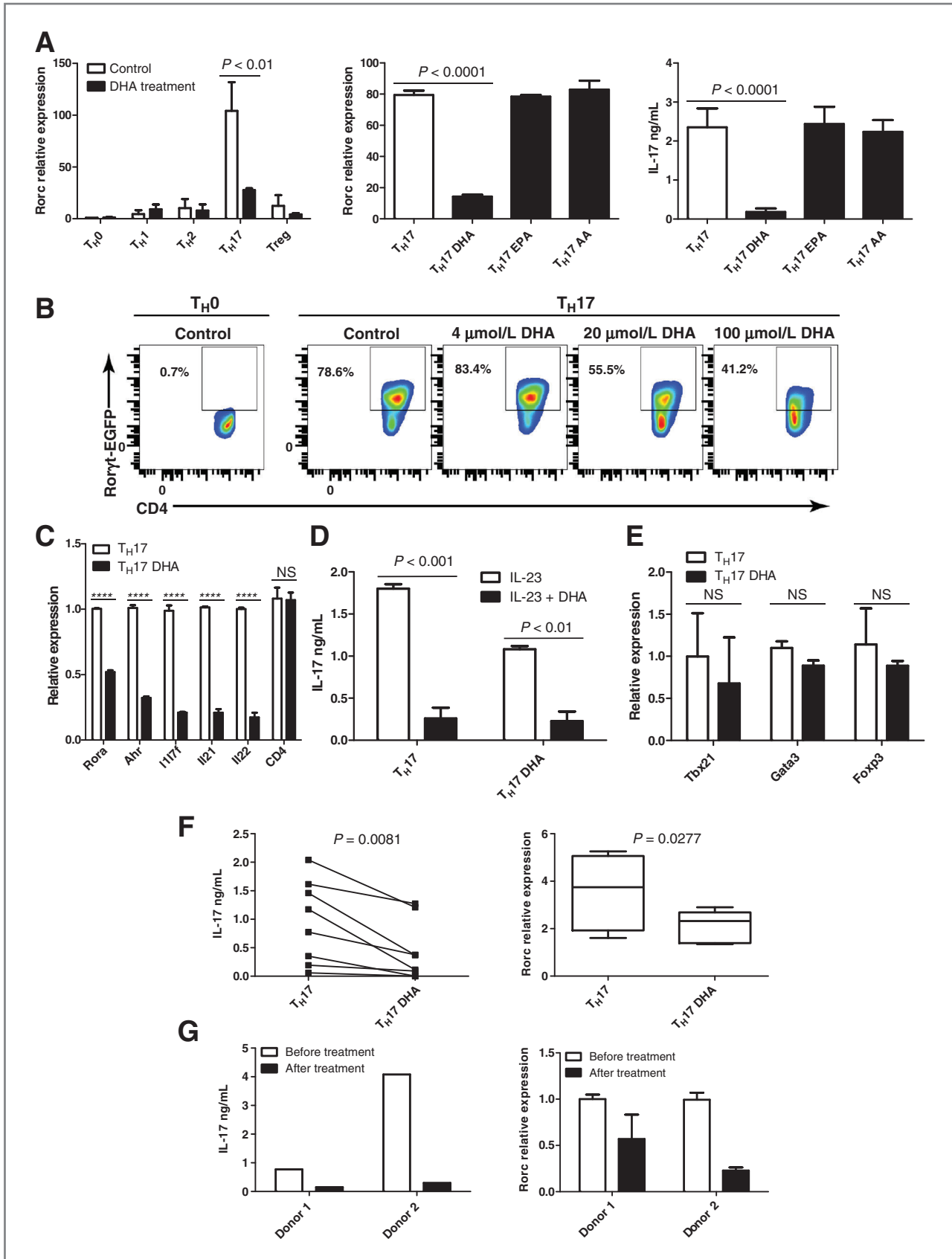


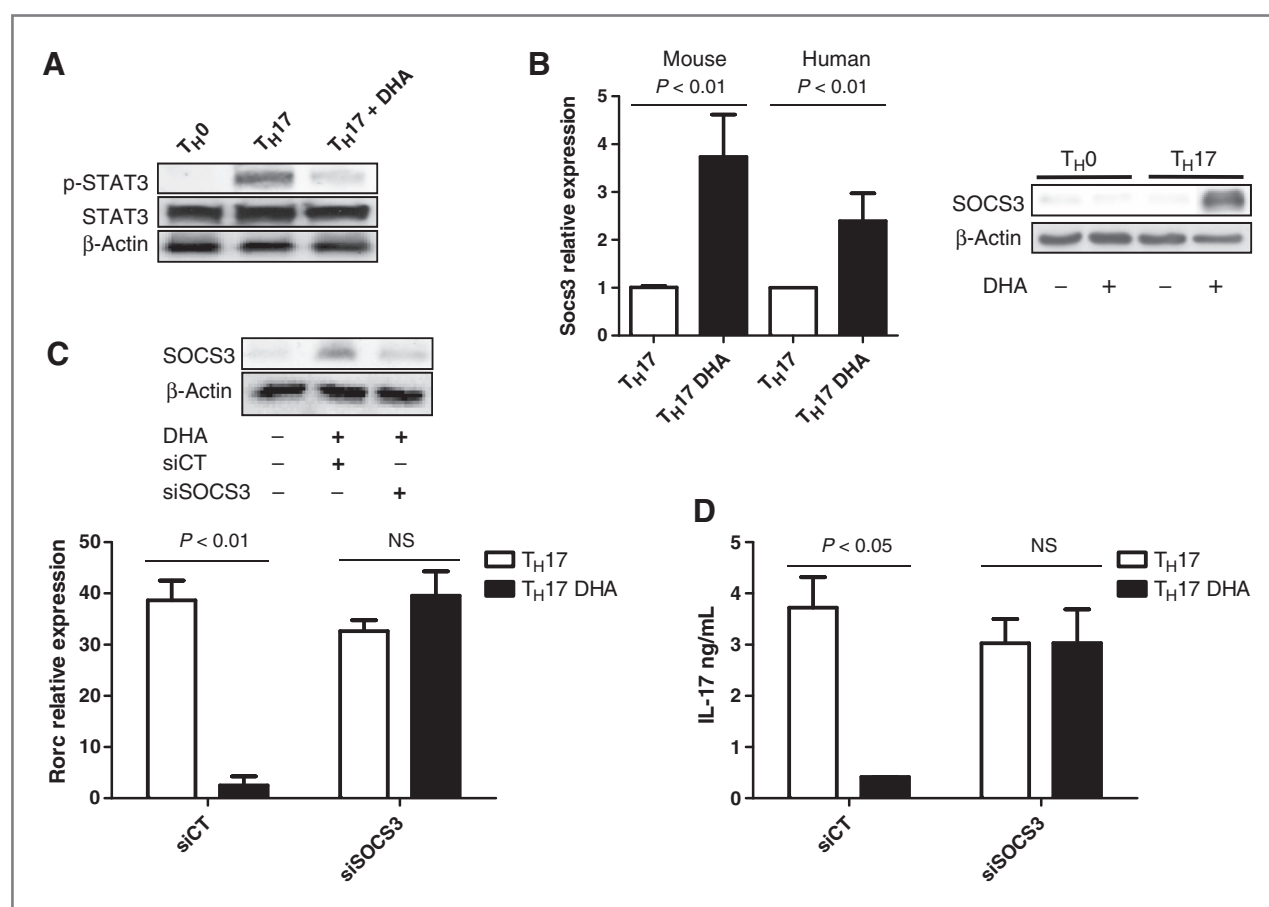
Figure 1. DHA-enriched diet reduces the capacity of naïve CD4<sup>+</sup> T cells to differentiate into T<sub>H17</sub> cells. Cell-sorted naïve CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup> CD44<sup>lo</sup> T cells were isolated from mice under a control or a DHA-enriched diet and differentiated into T<sub>H0</sub>, T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, Treg, or T<sub>H17</sub> cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours. A and B, qRT-PCR analysis of *Tbx21*, *Gata3*, *Foxp3* (A) and *Rorc* (B) mRNA expression. Expression is presented relative to *Actb* expression. C, ELISA analyses of IL-17 (left), IFN-γ (middle), and IL-4 (right) in supernatants of CD4<sup>+</sup> T cells differentiated for 3 days. D, flow cytometry analysis of intracellular staining for IFN-γ, IL-4, and IL-17, respectively, in naïve CD4<sup>+</sup> T cells polarized in T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, and T<sub>H17</sub> conditions assessed on day 5 of culture. Numbers beside outlined areas indicate percentage cells in gate. Representative data from 1 of 3 independent experiments are shown. NS, not significant.

ccccctgcatctgttcc-3'; *mmp9* ctgtcggtgtggttcagt-3' and agacacatagacggcatcc-3'; *cyp27* 5'-gggcactagccagattcaca-3' and 5'-ctatgtgctgcacttgccc-3', *clu* 5'-ccattgtcccagatcagca-3' and 5'-

aggaggagcgcactggag-3'; *vegfr* 5'-aagagagtctggcctgctg-3' and 5'-ctgctcgggtgtctgctt-3'; and *vegf* 5'-aatgtttctccgctctgaa-3' and 5'-gcttctacagcagacaga-3'.







**Figure 3.** DHA treatment impairs STAT3 phosphorylation and upregulates SOCS3 in TH17 cells. **A**, expression of mouse p-STAT3 in TH0- and TH17-differentiated cells for 24 hours treated or not with DHA was determined by Western blotting. **B**, SOCS3 mRNA expression level was assessed in mouse and human control TH17 cells or DHA-treated counterparts after 3 hours of differentiation by qRT-PCR analysis (left) and activation of mouse protein SOCS3 was examined by immunoblotting (right) in CD4<sup>+</sup> T cells polarized under TH0 or TH17 conditions 24 hours long in presence or not of DHA. **C**, CD4<sup>+</sup> T cells were transfected with a control siRNA (siCT) or a siRNA specific for SOCS3 (siSOCS3) for 24 hours before being differentiated for further 24 hours into control or DHA TH17-cell driving conditions, then SOCS3 expression was determined by Western blotting (top) and *Rorc* mRNA induction (bottom) monitored by qRT-PCR. **D**, TH17 cells were generated and transfected as in **C** and IL-17 release was assayed by ELISA. Representative data from 1 of 3 experiments are shown. NS, not significant.

**Statistical analyses**

Statistical analysis was conducted using Prism software (Graph Pad software). For the analysis of experimental data, comparison of continuous data was achieved by the Mann-Whitney *U* test and comparison of categorical data by Fisher exact test, as appropriate. All *P* values are two-tailed. *P* values less than 0.05 were considered significant. Data are represented as mean ± SD.

**Results**

***In vivo* administration of DHA impairs mouse TH17 cell differentiation from naïve CD4 T cells**

Despite reports suggesting that DHA could dampen the production of proinflammatory cytokines from innate immune cells (21, 22), whether DHA affects naïve CD4 T-cell differentiation in a cell-intrinsic manner has not been explored. To test this, we first examined the ability of naïve CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T cells

**Figure 2.** DHA impairs TH17 differentiation *in vitro*. **A**, RNA isolated from naïve CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup> cells differentiated into TH0, TH1, TH2, Treg, or TH17 cells with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence or absence of DHA (20 μmol/L) was subjected to qRT-PCR relative to the expression of mRNA-encoding mouse *Actb* to examine the expression of *Rorc* at 72 hours following activation (left). qRT-PCR analysis of *Rorc* expression and ELISA of IL-17 in supernatants of TH17 cells polarized with or without DHA, EPA (eicosapentaenoic acid, n-3 PUFA), or AA (arachidonic acid, n-6 pufa) on day 3 of culture (right). **B**, naïve CD4<sup>+</sup> T cells from RORγt-eGFP reporter mice were differentiated into TH17 cells for 72 hours in the presence of indicated escalating doses of DHA and the proportion of RORγt-expressing cells was assessed by flow cytometry. Numbers beside outlined areas indicate percentage cells in each gate. **C** and **E**, TH17 cells were generated as in **A** and the expression of the *Rora*, *Ahr*, *il17f*, *il21*, *il22*, and *CD4* genes (**C**) and *Tbx21*, *Gata3*, and *Foxp3* genes (**E**) was assessed by qRT-PCR. **D**, TH17 cells were generated with or without DHA as in **A**, first round, and reactivated for further 48 hours in presence of IL-23 with an additional DHA treatment or not (second round), then the levels of IL-17 released from these cells after the second round of stimulation were determined by ELISA. **F**, human TH17 cells were generated from naïve peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells isolated from healthy volunteers polarized for 72 hours *in vitro* and treated or not with DHA, then IL-17 secreted in supernatants and *Rorc* mRNA level were assessed, respectively, by ELISA (left) and qRT-PCR (right). **G**, same analyses as in **F** but carried out from differentiated TH17 cells generated before or after a 3-week long DHA supplementation diet. Representative data from 1 of 3 experiments are shown. \*\*\*\*, *P* < 0.0001; NS, not significant.



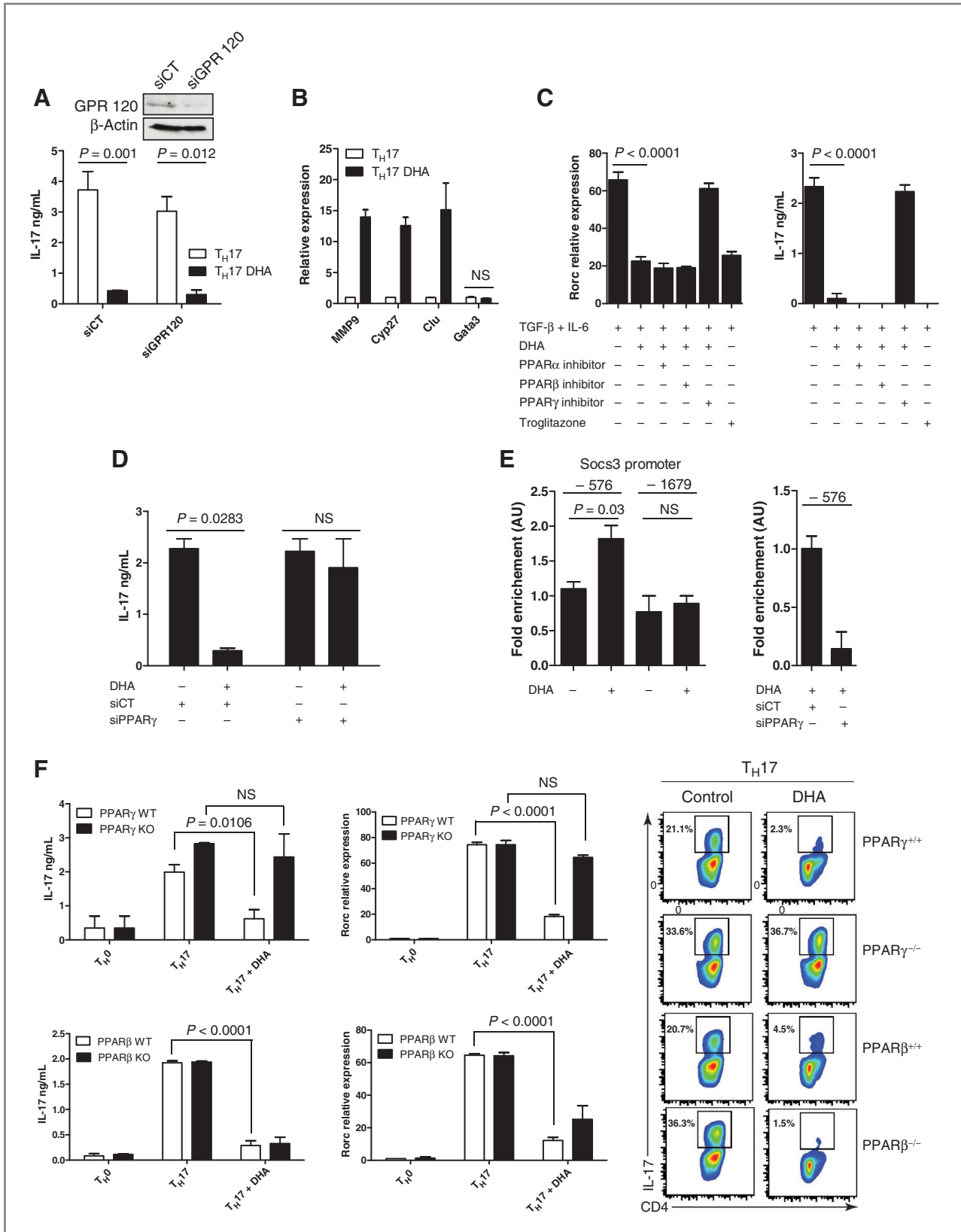


Figure 4. PPAR $\gamma$  transactivates Socs3 upon activation by DHA. A, expression of mouse GPR120 (top) and IL-17 release from control or GPR120 siRNA-transfected T<sub>H</sub>17 cells (bottom) were detected after 48 hours of polarization with or without DHA by Western blotting and ELISA, respectively. B, relative

isolated from mice fed a control or DHA-enriched diet for 3 weeks to differentiate into effector T-cell subsets following activation in absence of antigen-presenting cells. DHA-enriched diet led to accumulation of DHA within splenocytes as previously described (Supplementary Fig. S2; ref. 18). Upon examining T-cell polarization, DHA failed to significantly alter the expression of the transcription factors *Tbx21*, *Gata3*, and *Foxp3* that respectively specify the  $T_H1$ ,  $T_H2$ , and regulatory T cell (Treg) lineages (Fig. 1A). However, naïve  $CD4^+$  T cells isolated from mice under a DHA-enriched diet featured a poor capacity to differentiate into  $T_H17$  cells under  $T_H17$ -polarizing conditions, as illustrated by their weak expression of the  $T_H17$ -cell transcription factor *Rorc* (Fig. 1B). By assessing IL-17a secretion from  $T_H17$  cells generated from mice under a DHA-enriched diet by ELISA, we found reduced IL-17a secretion in comparison with controls, whereas IFN- $\gamma$  or IL-4 production from  $T_H1$  and  $T_H2$  cells were not affected (Fig. 1C). Intracellular staining data confirmed dampened IL-17a secretion from  $T_H17$  cells from mice receiving DHA *in vivo*, whereas the respective production of IFN- $\gamma$  or IL-4 from  $T_H1$  and  $T_H2$  cells remained unaffected (Fig. 1D). Overall, these results suggest that DHA selectively affects  $T_H17$  cell differentiation *in vivo*.

#### DHA inhibits mouse and human $T_H17$ cell differentiation in a cell-intrinsic manner

To test whether DHA directly affects  $T_H17$  cell development, we differentiated naïve  $CD4^+$  T cells without antigen-presenting cells under  $T_H17$  cell-polarizing conditions in the presence of DHA. We observed a marked reduction of *Rorc* expression in  $T_H17$  cells upon DHA treatment, confirming that DHA impairs  $T_H17$  cell differentiation (Fig. 2A). This inhibition is specific for DHA as other PUFAs such as eicosapentaenoic or arachidonic acids did not impair  $T_H17$  cell differentiation (Fig. 2A). To study further the impact of DHA on  $T_H17$  differentiation, we generated  $T_H17$  cells from *Roryt*-eGFP reporter mice with increasing doses of DHA. DHA reduced the proportion of *Roryt*-expressing cells in a dose-dependent manner, corroborating the DHA capacity to inhibit  $T_H17$  cell differentiation (Fig. 2B). In addition, we also explored the ability of DHA to affect other  $T_H17$ -related genes and found that DHA impaired the expression of *Rora*, *Ahr*, *il17f*, *il21*, and *il22*, suggesting that DHA globally affects the  $T_H17$  cell differentiation program (Fig. 2C). IL-23 is essential to maintain the proinflammatory  $T_H17$  cell program both *in vitro* and *in vivo* (23). Because DHA blunted the primary differentiation of naïve  $CD4$  T cells into effector  $T_H17$  cells, we explored the ability of DHA to influence IL-23 capacity to restimulate engaged  $T_H17$

cells. We found that DHA was also able to reduce IL-17a secretion from engaged  $T_H17$  cells restimulated with IL-23 (Fig. 2D). To test whether DHA skewed  $T_H17$  cell differentiation toward another  $CD4$  effector T-cell subset, we monitored the expression of *Tbx21*, *Gata3*, and *Foxp3* genes in  $T_H17$  cells treated with DHA. We found that DHA failed to induce any of the transcription factors defining the  $T_H1$ ,  $T_H2$ , or Treg lineages, indicating that DHA restricts but does not skew  $T_H17$  cell differentiation *in vitro* (Fig. 2E). We tested whether DHA also affects human  $T_H17$  cell differentiation. For this, we first differentiated naïve human  $CD4^+$  T cells isolated from the blood of healthy volunteers into  $T_H17$  cells in the presence of DHA. In line with our findings with mouse T cells, we found that DHA also prevented human  $T_H17$  cell differentiation (Fig. 2F). Similarly, upon assessing  $T_H17$  cell induction from naïve human  $CD4$  T cells obtained from healthy individuals before or after 3 weeks of DHA intake as a diet supplement, we found that oral DHA intake decreased  $T_H17$  cell differentiation (Fig. 2G). Altogether, these findings indicate that DHA restrains mouse and human  $T_H17$  cell differentiation.

#### DHA interferes with $T_H17$ cell differentiation by inducing *Socs3*

The transcription factor STAT3 was shown to transactivate the *Il17a/f* and the *Rorc* promoters (24, 25). Because DHA dampened IL-17a/f secretion and *Rorc* expression in developing  $T_H17$  cells, we hypothesized that DHA negatively regulates STAT3 activation during  $T_H17$  cell differentiation. To test this, we induced  $T_H17$  cells from naïve  $CD4^+$  T cells *in vitro* in presence or absence of DHA. As expected, we noted a robust STAT3 (p-STAT3) phosphorylation in  $T_H17$  cells generated without DHA (Fig. 3A). In contrast,  $CD4$  T cells incubated under  $T_H17$ -polarizing conditions with DHA featured a weak level of p-STAT3, confirming that DHA reduces STAT3 signaling in  $T_H17$  cells (Fig. 3A). Because SOCS3 is a major regulator of STAT3 phosphorylation in  $T_H17$  cells (24), we hypothesized that the DHA-mediated downregulation of p-STAT3 may be due to increased SOCS3 expression. We found that SOCS3 mRNA and protein expression was induced by DHA treatment in mouse and human  $T_H17$  cells, suggesting that the DHA-mediated downregulation of  $T_H17$  cell differentiation could be related to SOCS3 induction (Fig. 3B). To investigate the involvement of SOCS3 in the capacity of DHA to control  $T_H17$  cell differentiation, we downregulated SOCS3 expression in T cells differentiated under  $T_H17$ -cell skewing conditions with DHA using siRNA. We found that SOCS3 silencing blunted the capacity of DHA

expression of PPAR $\gamma$  target genes (*MMP9*, *Cyp27*, and *Clu*) and *Gata3* as control within  $T_H17$  cells exposed or not to DHA *in vitro*. C, mouse  $T_H17$  cells were differentiated as described in Materials and Methods with control or DHA in presence or absence of specific PPARs ligands (PPARs inhibitors and troglitazone). *Rorc* mRNA level was monitored in these cells (left) and the amount of IL-17 secreted was quantified by ELISA (right) at 3 days following activation. D, ELISA of IL-17 in supernatants of  $T_H17$  cells treated or not with DHA for 48 hours after transfection with control (siCT) or PPAR $\gamma$  siRNA (siPPAR $\gamma$ ). E, ChIP analysis of the interaction between PPAR $\gamma$  and *Socs3* promoter in *in vitro* differentiated  $T_H17$  cells transfected either with siCT or siPPAR $\gamma$  after DHA treatment or not. Analysis on the 2 putative binding sites for PPAR $\gamma$  on *Socs3* promoter (–1679 and –576) is shown. F, naïve  $CD4^+$  T cells from PPAR $\gamma$ - (top) and PPAR $\beta$  (bottom)-deficient mice or WT counterparts were polarized into  $T_H0$ ,  $T_H17$ , and DHA-treated  $T_H17$  lymphocytes. At day 3 of culture, IL-17 secretion and *Rorc* expression levels were monitored by ELISA and qRT-PCR, respectively. At day 5 and after restimulation, flow cytometry of the intracellular production of IL-17 by these cells in presence or not of DHA was assessed (right). Representative data from 1 of 3 experiments are shown. NS, not significant; KO, knockout.

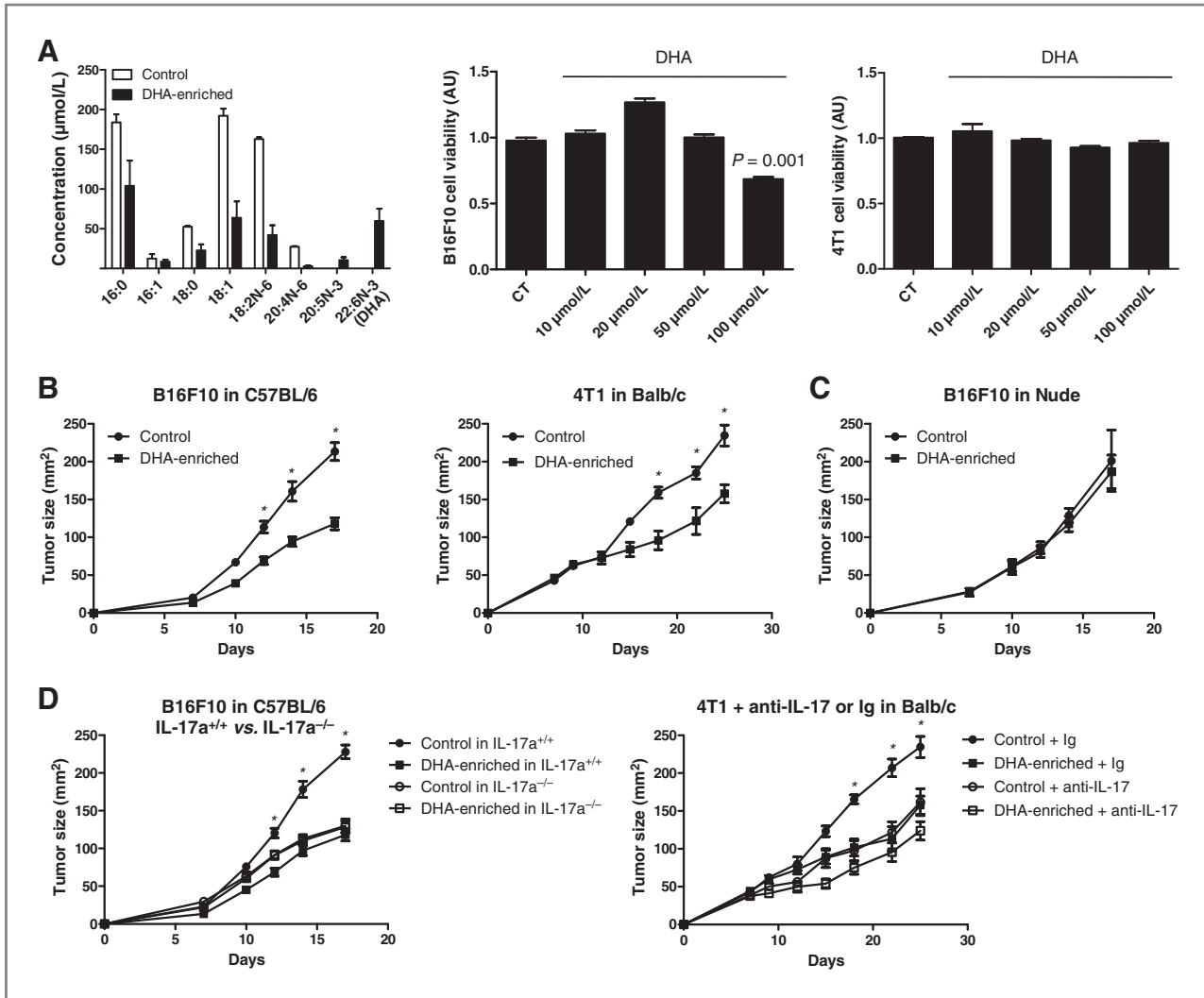


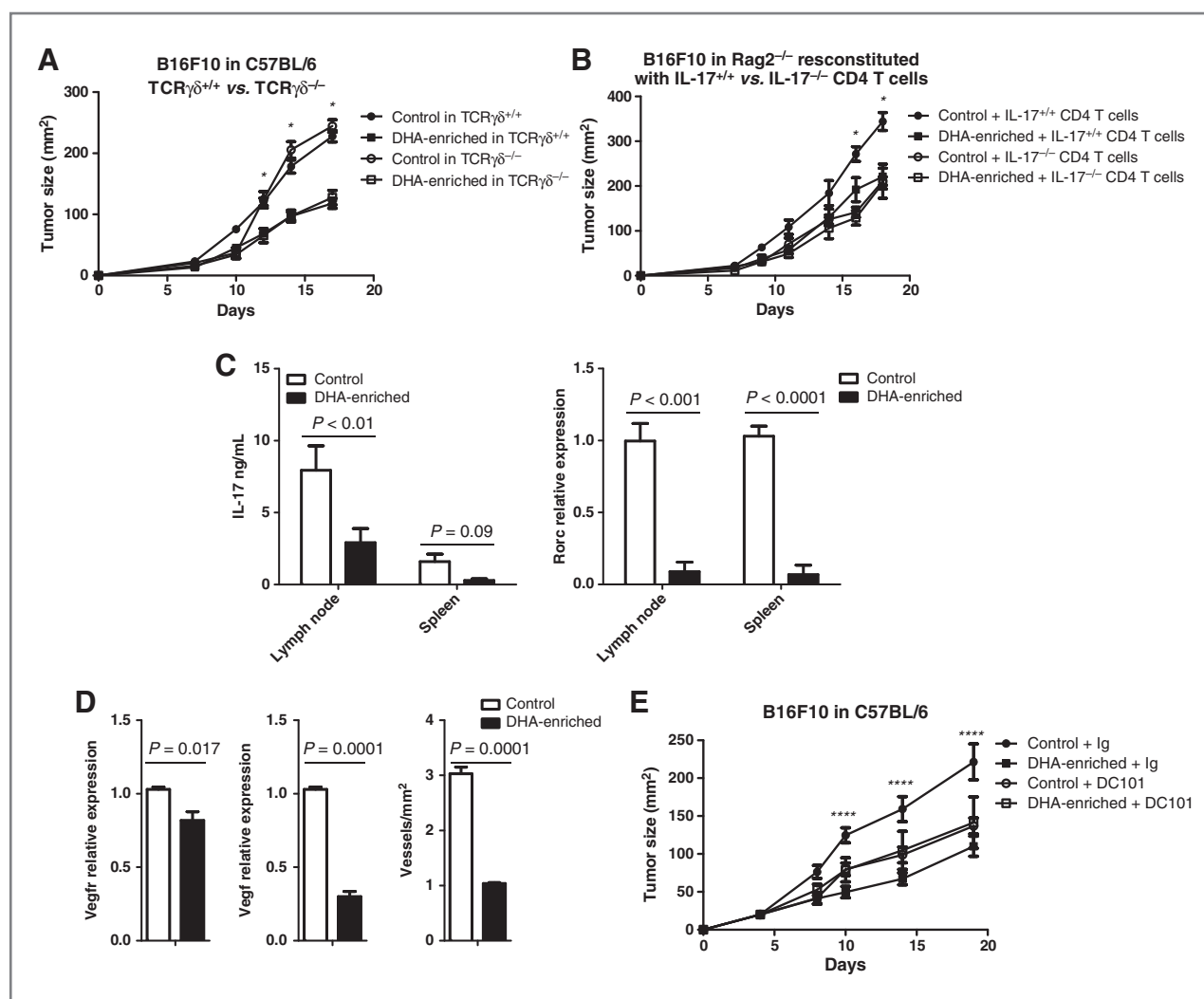
Figure 5. DHA prevents tumor outgrowth *in vivo* in an IL-17-dependent manner. A, plasma major fatty acids concentration of mice under control or DHA-enriched diet was assessed by gas chromatographic analysis (left). B16F10 melanoma and 4T1 mammary adenocarcinoma tumor cells (respectively, middle and right) were incubated with increasing doses of DHA for 72 hours and the cell viability was assessed by MTT assay. B, C57BL/6 (left) and BALB/c mice (right) under control or DHA-enriched diet were respectively inoculated with B16F10 and 4T1 tumor cells and tumor growth was monitored over 3 weeks. C, same as in B, but B16F10 were injected subcutaneously in Nude mice. D, monitoring of tumor growth of respectively B16F10 melanoma cells in C57BL/6 and IL17a<sup>-/-</sup> mice (left) and of 4T1 in BALB/c mice injected with an anti-IL-17 antibody (200  $\mu\text{g/day}$  injected on day 0, 1, 2, 3, 4, and 6) or control rat immunoglobulin G (IgG). All along these experiments, animals were either given control or DHA-enriched diet \*,  $P < 0.05$ .

to restrain IL-17 and ROR $\gamma$ t expression in T<sub>H</sub>17 cells (Fig. 3C and D). Collectively, our findings suggest that DHA restrains T<sub>H</sub>17 cell differentiation by interfering with STAT3 signaling through SOCS3 induction.

#### DHA prevents T<sub>H</sub>17 cell differentiation in a PPAR $\gamma$ -dependent manner

To unravel the mechanism accounting for SOCS3 induction in developing T<sub>H</sub>17 cells upon DHA treatment, we investigated the intracellular signaling pathways engaged by DHA on T<sub>H</sub>17 cells. GPR120 was recently identified as an omega-3 fatty acid receptor (26). To test the involvement of GPR120 in the DHA-driven impairment of T<sub>H</sub>17 cell differentiation, we downregulated GPR120 expression with siRNA

in naïve T cells and analyzed the effect of DHA during T<sub>H</sub>17 differentiation. Our results showed no significant differences in T<sub>H</sub>17 polarization between cells transfected with control or GPR120 siRNA, indicating that the decreased T<sub>H</sub>17 cell induction upon DHA treatment does not depend on GPR120 (Fig. 4A). PPAR $\gamma$  is another proposed receptor for omega-3 fatty acid. Synthetic PPAR $\gamma$  ligands have been reported to induce *Socs3* expression and inhibit STAT3 activation (27). Given that DHA interfered with T<sub>H</sub>17 cell differentiation through STAT3 signaling pathway blockade, we hypothesized that the effects of DHA on T<sub>H</sub>17 cells relied on the transcription factor PPAR $\gamma$ . Gene expression analysis revealed that the known PPAR $\gamma$  target genes *MMP9*, *Cyp27*, and *Clu* were induced in DHA-treated T<sub>H</sub>17 cells, suggesting



**Figure 6.** DHA limits CD4 T cell-derived IL-17 secretion and tumor angiogenesis. **A**, C57BL/6  $\gamma\delta$ TCR-deficient mice under control or DHA-enriched diet were respectively inoculated with B16F10 tumor cells and tumor growth was monitored over 3 weeks. **B**,  $Rag2^{-/-}$  mice received intravenous  $\alpha\beta$  CD4 T cells isolated from either IL-17<sup>+/+</sup> or IL-17<sup>-/-</sup> mice and were subsequently fed a control or DHA-enriched diet. Five weeks later, mice were injected with B16F10 melanoma cancer cells and tumor growth was monitored. Pooled data from 2 experiments are shown. **C**, CD4<sup>+</sup> T cells isolated from draining lymph nodes and spleen of B16F10 tumor-bearing immunocompetent mice were activated 3 days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Then, IL-17 release was controlled by ELISA (left) and *Rorc* mRNA expression level was determined by qRT-PCR analysis (right). **D**, qRT-PCR analysis of *Vegfr* and *Vegf* mRNA level in B16F10 tumor extracts from immunocompetent tumor-bearing mice treated as in Fig. 5B and number of CD31-positive blood vessels in these tumors. **E**, same as in Fig. 5B but C57BL/6 mice were treated or not with an anti-VEGFR2 (clone DC101) antibody (200  $\mu$ g/day injected on day 1 and 5). Representative data from 1 of 3 experiments are shown. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

that PPAR $\gamma$  signaling is activated by DHA treatment on T<sub>H</sub>17 cells (Fig. 4B). In addition, the DHA effect on T<sub>H</sub>17 cell differentiation was markedly reduced in the presence of a PPAR $\gamma$  inhibitor GW9662, but not with a PPAR $\beta$  inhibitor GSK0660 or PPAR $\alpha$  inhibitor GW6471, as measured by IL-17 secretion and *Rorc* expression (Fig. 4C). Moreover, PPAR $\gamma$  agonist troglitazone neutralized IL-17 secretion from T<sub>H</sub>17 cells to a comparable extent to DHA, suggesting that PPAR $\gamma$  activation is involved in DHA effects on T<sub>H</sub>17 cells (Fig. 4C). To validate the elective involvement of PPAR $\gamma$  in the intracellular effects of DHA on T<sub>H</sub>17 cells, we downregulated PPAR $\gamma$  expression with siRNA and tested the ability of DHA to inhibit T<sub>H</sub>17 cell differentiation in absence of PPAR $\gamma$ . We

found that silencing PPAR $\gamma$  completely abolished the ability of DHA to restrain T<sub>H</sub>17 cell induction (Fig. 4D). Although PPAR $\gamma$  agonists induce *Socs3* expression (27, 28), the direct link between PPAR $\gamma$  and SOCS3 remains unclear. To test whether the DHA-driven *Socs3* induction is directly due to PPAR $\gamma$  activation, we conducted a bioinformatic analysis of the *Socs3* promoter and found 2 putative binding sites for PPAR $\gamma$  at positions -1679 and -576 from the transcription start site. By conducting ChIP, we found that PPAR $\gamma$  binds to the *Socs3* promoter only at position -576 in DHA-treated T<sub>H</sub>17 cells as compared with control T<sub>H</sub>17 cells (Fig. 4E). We further checked the specificity of this interaction by downregulating PPAR $\gamma$  expression by siRNA and confirmed that

the amount of PPAR $\gamma$ -binding *Socs3* promoter was accordingly reduced (Fig. 4E). Finally, we tested the effects of DHA on naïve T cells from WT-, PPAR $\gamma$ -, or PPAR $\beta$ -deficient mice. In line with our results obtained with the PPAR inhibitors, we found that while DHA could suppress T<sub>H</sub>17 cell differentiation from WT- and PPAR $\beta$ -deficient T cells, PPAR $\gamma$ -deficient T cells were totally unaffected by DHA treatment (Fig. 4F). Altogether, these findings show that the ability of DHA to hamper T<sub>H</sub>17 cell differentiation is strictly dependent on PPAR $\gamma$ -dependent *Socs3* expression.

### DHA prevents tumor growth *in vivo* in an IL-17-dependent manner

Although DHA was proposed to promote cancer cell death (29), we found that DHA did not exert direct cytotoxic effects on mouse melanoma B16F10 and in 4T1 mammary adenocarcinoma tumor cells *in vitro* at concentrations that could be reached *in vivo* (60  $\mu$ mol/L; Fig. 5A). However, we noted that the DHA-enriched diet delays subcutaneous tumor growth *in vivo* in both cancer models (Fig. 5B). In contrast, DHA did not show any antitumor efficacy in nude mice in both models suggesting that DHA mediates its anticancer function through T cells (Fig. 5C and Supplementary Fig. S3). Given that DHA impedes proinflammatory cytokine release, which has been proposed to contribute to B16F10 and 4T1 tumor growth (8, 30–32), we tested whether DHA affected tumor growth *in vivo* in these 2 tumor models by affecting IL-1, IL-6, or IL-17 release. DHA still exhibited *in vivo* anticancer activity against B16F10 tumors in absence of IL-1 and IL-6 (Supplementary Fig. S4). However, DHA failed to exhibit any effect on tumor progression in *IL-17a*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that the anticancer effects of DHA are dependent on IL-17 (Fig. 5D). These results were confirmed by neutralizing IL-17 *in vivo* in the 4T1 tumor model (Fig. 5D). As a control, IL-17 mAb did not exert any direct cytotoxic effect on tumor cells, ruling out any direct effect of IL-17 on tumor cell growth (Supplementary Fig. S5).

Because  $\gamma\delta$  T cells and T<sub>H</sub>17 cells are major IL-17 sources *in vivo*, we investigated whether DHA anticancer efficacy relied on  $\gamma\delta$  T cells and IL-17-producing CD4 T cells. We found that the DHA-enriched diet could prevent tumor growth in  $\gamma\delta$ TCR-deficient mice, ruling out any significant contribution of these cells in DHA anticancer activity (Fig. 6A). However, upon testing DHA antitumor effect in T-cell-deficient Rag2<sup>-/-</sup> mice reconstituted with either IL-17<sup>+/+</sup> or IL-17<sup>-/-</sup>  $\alpha\beta$  CD4 T cells, we failed to note any therapeutic benefit of the DHA diet in mice that had received IL-17-deficient CD4 T cells (Fig. 6B). We also measured T<sub>H</sub>17 cell responses from WT mice under the control or DHA-enriched diet. In line with our previous findings, draining lymph node CD4 T cells from B16F10 tumor-bearing mice under the DHA-enriched diet expressed lower amounts of IL-17 and *Rorc* than controls (Fig. 6C). Together these data suggest that DHA may affect tumor growth via this capacity to regulate IL-17 secretion from T<sub>H</sub>17 cells.

IL-17A is a proangiogenic factor that favors neovascularization and tumor growth *in vivo* via its capacity to induce VEGF production (8, 33). In line with the documented angiogenic properties of IL-17A, we noted that B16F10 tumors from mice under DHA-enriched diet featured decreased tumor

vasculature reflected by reduced *vegfr* and *vegf* expression and reduced number of CD31-positive blood vessels (Fig. 6D). Finally, to determine the role of VEGF in the antitumor effect of DHA, we treated tumor-bearing mice fed or not a DHA-enriched diet with the VEGF receptor (VEGFR)-blocking mAb, DC101. We observed that while DHA and anti-VEGF therapy exhibited similar antitumor effects, these treatments failed to synergize (Fig. 6E). Collectively, these data suggest that the activity of DHA relies on the prevention of IL-17-dependent tumor neoangiogenesis.

### Discussion

Although activation of the transcription factor PPAR $\gamma$  has been associated with reduced inflammation, the intracellular series of events consecutive to PPAR $\gamma$  activation remain incompletely understood and the actual involvement of PPAR $\gamma$  in the anti-inflammatory effects of PPAR $\gamma$  ligands remains debated (34, 35). In this study, we propose what we believe to be a novel molecular pathway by which PPAR $\gamma$  contributes to limit the secretion of the proinflammatory cytokine IL-17. DHA activates PPAR $\gamma$ , which binds to the *Socs3* promoter and drives *Socs3* expression in nascent T<sub>H</sub>17 cells, leading to reduced STAT3 phosphorylation, *Rorc* expression and IL-17 secretion. Finally, DHA prevents tumor growth *in vivo* through the downregulation of IL-17 production.

Although our data indicate that DHA inhibits T<sub>H</sub>17 cell induction through downregulating the STAT3 signaling pathway, the strong inhibitory effect of DHA on T<sub>H</sub>17 cell differentiation suggests that DHA could act at several levels on the T<sub>H</sub>17 cell differentiation program. Indeed, activation of PPAR $\gamma$  has been shown to prevent the clearance of corepressors from the *Roryt* promoter (36), resulting in repressed T<sub>H</sub>17 cell generation. We cannot rule out that this signaling pathway plays an additional role in DHA effect on differentiating T<sub>H</sub>17 cells.

The links between inflammation and cancer have been thoroughly documented as illustrated by data showing an increased risk of patients suffering from inflammatory bowel disease to develop cancer compared with healthy individuals (37). Chronic inflammation can indeed contribute to cell transformation and cancer formation. Dietary supplementation of DHA has been shown to alleviate the severity of intestinal inflammation (38, 39) in experimental models of colitis and in inflammatory bowel disease in humans (40, 41). These findings possibly explain why dietary (n-3) PUFAs intake was associated with decreased risk of cancer (42, 43). However, recent data indicate that DHA also improves outcome of chemotherapy in patients with metastatic breast cancer, suggesting that it not only affects cancer incidence, but can be therapeutically used to prevent tumor growth (44). Our study brings up evidence that the anticancer effects of DHA could rely on its ability to dampen IL-17 levels *in vivo*.

The role of T<sub>H</sub>17 cells during cancer growth remains intensely debated. Adoptive transfer experiments have shown the anticancer potential of both mouse and human T<sub>H</sub>17 cells (45, 46). It was further shown recently that the remarkable ability of T<sub>H</sub>17 cells to eliminate tumors in these settings relied on their ability to self-renew and transdifferentiate into IFN- $\gamma$ -producing cells *in vivo* (46). However, in some human



cancers IL-17 was shown to be associated with poor prognosis (47–49). Mouse and human studies revealed an association between IL-17 levels in the tumor bed, VEGF, and blood vessels number (33, 50). In addition, IL-17 has the capacity to directly trigger VEGF release from VEGFR-expressing cells such as cancer cells and stromal cells (33). These data support the contention that IL-17 is an important factor, which drives VEGF-dependent neoangiogenesis during cancer growth. Anti-VEGF therapies are being implemented for cancer treatment in humans but are expensive. In this regard, our study supports the antiangiogenic property of a DHA-enriched diet via its capacity to regulate IL-17 production and VEGF-related angiogenesis. If such results could be confirmed in patients with cancer, DHA should be considered as a potential antiangiogenic candidate for future clinical trials.

Altogether, our study unraveled that DHA-mediated PPAR $\gamma$  activation limits T<sub>H</sub>17 cell differentiation by inducing SOCS3 expression. Because our results suggest that the activity of DHA is relevant in humans, DHA administration might prove beneficial in diseases where IL-17 cytokine secretion is undesirable.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### References

1. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13:1050–9.
2. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009;15:1170–8.
3. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436–44.
4. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517.
5. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* 2006;126:1121–33.
6. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, et al. Cutting edge: an *in vivo* requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 2007;179:4313–7.
7. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007;282:9358–63.
8. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 2009;206:1457–64.
9. Bang HO, Dyerberg J, Nielsen AB. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet* 1971;1:1143–5.
10. Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2657–61.
11. Finocchiaro C, Segre O, Fadda M, Monge T, Scigliano M, Schena M, et al. Effect of n-3 fatty acids on patients with advanced lung cancer: a double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2012;108:327–33.
12. Li H, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R, Mon WY, Wheeler DC, et al. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR- $\gamma$ -dependent mechanism. *Kidney Int* 2005;67:867–74.
13. Siddiqui RA, Harvey KA, Xu Z, Bammerlin EM, Walker C, Altenburg JD. Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects. *Biofactors* 2011;37:399–412.
14. Lochner M, Peduto L, Cherrier M, Sawa S, Langa F, Varona R, et al. *In vivo* equilibrium of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> and regulatory IL-10<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> ROR $\gamma$  T cells. *J Exp Med* 2008;205:1381–93.
15. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002;17:375–87.
16. Nadra K, Quignodon L, Sardella C, Joye E, Mucciolo A, Chrast R, et al. PPAR $\gamma$  in placental angiogenesis. *Endocrinology* 2010;151:4969–81.
17. Nadra K, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, et al. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol* 2006;26:3266–81.
18. Triboulet C, Hichami A, Denys A, Khan NA. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids exert antihypertensive effects by modulating calcium signaling in T cells of rats. *J Nutr* 2001;131:2364–9.
19. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–7.
20. Pace-Asciak CR. One-step rapid extractive methylation of plasma nonesterified fatty acids for gas chromatographic analysis. *J Lipid Res* 1989;30:451–4.
21. Almallah YZ, El-Tahir A, Heys SD, Richardson S, Eremin O. Distal procto-colitis and n-3 polyunsaturated fatty acids: the mechanism (s) of natural cytotoxicity inhibition. *Eur J Clin Invest* 2000;30:58–65.

#### Authors' Contributions

**Conception and design:** S. Ladoire, A. Hichami, F. Ghiringhelli, L. Apetoh  
**Development of methodology:** F. Végran, B. Ryffel, A. Hichami  
**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** H. Berger, F. Végran, M. Chikh, F. Gilardi, S. Ladoire, H. Bugaut, G. Mignot, M. Bruchard, B. Ryffel, C. Pot, B. Desvergne, L. Apetoh  
**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** H. Berger, F. Végran, S. Ladoire, L. Apetoh  
**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** H. Berger, F. Végran, M. Chikh, F. Gilardi, G. Mignot, C. Rébé, C. Pot, B. Desvergne, F. Ghiringhelli, L. Apetoh  
**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** F. Chalmin, V. Derangère, A. Cheviaux, C. Rébé  
**Study supervision:** L. Apetoh

#### Grant Support

The authors are supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (F. Ghiringhelli and F. Végran), the Fondation de France (F. Ghiringhelli), the Institut National du Cancer (F. Ghiringhelli), the Association pour la recherche sur le cancer (F. Ghiringhelli and G. Mignot), the Conseil Régional Bourgogne/INSERM (H. Berger), the Etat de Vaud and the Swiss National Funds for Research (B. Desvergne), the CNRS, FEDER, Le Studium, Orléans and Fondation pour la Recherche Médicale (B. Ryffel), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-PDOC-014-01; L. Apetoh), the Ligue Régionale contre le cancer Comité Grand-Est (L. Apetoh) and the European Community (Marie Curie Fellowship PCIG10-GA-2011-303719; L. Apetoh). This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received October 31, 2012; revised March 25, 2013; accepted April 4, 2013; published OnlineFirst April 25, 2013.

22. Kong W, Yen JH, Ganea D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation, inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 2011;25:872–82.
23. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233–40.
24. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8137–42.
25. Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* 2010;32:605–15.
26. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010;142:687–98.
27. Yu JH, Kim KH, Kim H. SOCS 3 and PPAR-gamma ligands inhibit the expression of IL-6 and TGF-beta1 by regulating JAK2/STAT3 signaling in pancreas. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:677–88.
28. Park EJ, Park SY, Joe EH, Jou I. 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. *J Biol Chem* 2003;278:14747–52.
29. Molinari R, D'Eliseo D, Manzi L, Zolla L, Velotti F, Merendino N. The n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid induces immunogenic cell death in human cancer cell lines via pre-apoptotic calreticulin exposure. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:1503–7.
30. Nam JS, Terabe M, Kang MJ, Chae H, Voong N, Yang YA, et al. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res* 2008;68:3915–23.
31. Garcia de G, Boyano D, Smith-Zubiaga I, Alvarez A, Canton I, Canavate L. Involvement of interleukin-6 in the biology and metastatic activity of B16F10 melanoma cells. *Eur Cytokine Netw* 1998;9:187–92.
32. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* 2007;67:10019–26.
33. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003;101:2620–7.
34. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004;351:1106–18.
35. Shibata N, Kawaguchi-Niida M, Yamamoto T, Toi S, Hirano A, Kobayashi M. Effects of the PPARgamma activator pioglitazone on p38 MAP kinase and I $\kappa$ B $\alpha$  in the spinal cord of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 2008;28:387–98.
36. Klotz L, Burgdorf S, Dani I, Saijo K, Flossdorf J, Hucke S, et al. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med* 2009;206:2079–89.
37. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G7–17.
38. Belluzzi A, Boschi S, Brignola C, Munarini A, Cariani G, Miglio F. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71:339S–42S.
39. Almallah YZ, Ewen SW, El-Tahir A, Mowat NA, Brunt PW, Sinclair TS, et al. Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect *in situ*. *J Clin Immunol* 2000;20:68–76.
40. Nieto N, Torres MI, Rios A, Gil A. Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J Nutr* 2002;132:11–9.
41. Shimizu T, Igarashi J, Ohtuka Y, Oguchi S, Kaneko K, Yamashiro Y. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E on colonic mucosal leukotriene generation, lipid peroxidation, and microcirculation in rats with experimental colitis. *Digestion* 2001;63:49–54.
42. Fradet V, Cheng I, Casey G, Witte JS. Dietary omega-3 fatty acids, cyclooxygenase-2 genetic variation, and aggressive prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 2009;15:2559–66.
43. Thiebaut AC, Chajes V, Gerber M, Boutron-Ruault MC, Joulin V, Lenoir G, et al. Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int J Cancer* 2009;124:924–31.
44. Bournoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C, Le Floch O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer* 2009;101:1978–85.
45. Kryczek I, Zhao E, Liu Y, Wang Y, Vatan L, Szeliga W, et al. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Sci Transl Med* 2011;3:104ra0.
46. Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, et al. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity* 2011;35:972–85.
47. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009;50:980–9.
48. Chen X, Wan J, Liu J, Xie W, Diao X, Xu J, et al. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* 2010;69:348–54.
49. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, 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* 2011;71:1263–71.
50. Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, 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* 2011;407:348–54.

## **Supplemental Figure Legends**

### **Supplemental Figure S1: Chemical composition of the diets.**

### **Supplemental Figure S2: DHA incorporates into splenic cells *in vivo*.**

The fatty acid composition of mouse splenic cells fed for at least three weeks under control or DHA-enriched diet was determined by gas-liquid chromatography as previously described in (Bligh & Dyer, 1959).

### **Supplemental Figure S3: *In vivo* DHA treatment fails to prevent mammary cancer cell growth *in vivo* in absence of T cells.**

Nude BALB/c mice under control or DHA-enriched diet were inoculated with 4T1 tumor cells and tumor growth was monitored over three weeks.

### **Supplemental Figure S4: IL-1 $\beta$ and IL-6 neutralization does not impair DHA *in vivo* effect on melanoma tumor outgrowth in competent mice.**

B16F10 tumor cells were injected subcutaneously into C57BL/6 mice fed with control or DHA-enriched diet for at least three weeks. Five days after tumor implantation, tumor-bearing mice were treated with either thirty micrograms of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra, Kineret® from Biovitrum) or control rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) injected i.p. three times a week (upper panel). To block IL-6 release, 200  $\mu$ g per day of IL-6-neutralizing antibody (clone MP5-20F3, BioXcell) were injected i.p. on day 0, 1, 2, 3, 4 and 6 following tumor challenge (lower panel) in comparison to control rat IgG injection. \* $p < 0.05$ .

### **Supplemental Figure S5: Blockade of IL-17 by monoclonal antibody does not exert any cytotoxic effect on mammary tumor cells *in vitro*.**



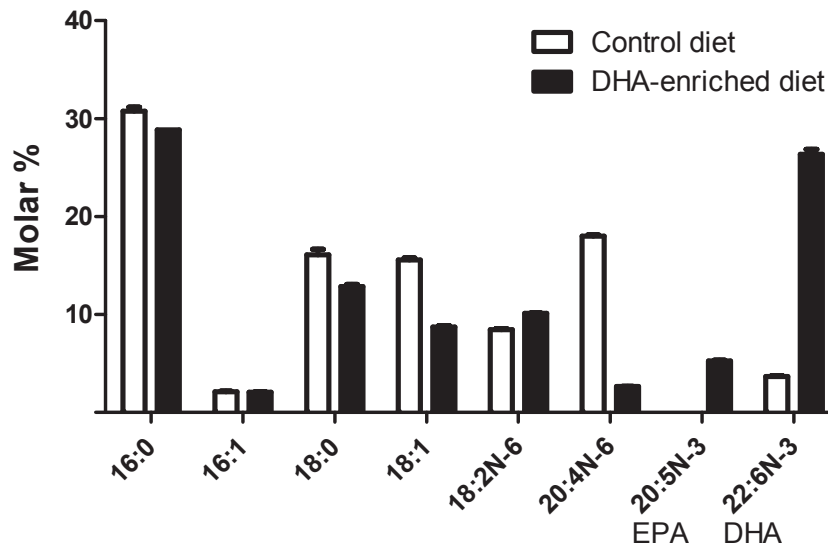
B16F10 melanoma cells were incubated with increasing doses of neutralizing anti-IL-17 antibody for 72 hours and the cell viability was assessed by MTT assay.

## Supplemental Figure 1

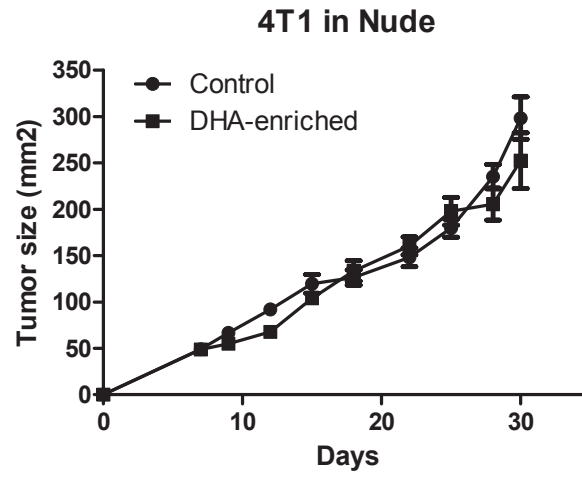
### Chemical composition of the diets

The chemical composition of the standard diet was as follows (g/kg dry diet): starch, 587; casein, 200; cellulose, 50; sucrose, 50; mineral mix, 40; vitamin mix, 20; dl-methionine, 3; sunflower oil (Lesieur, Neuilly-sur-Seine, France), 50. The fatty acid composition of control diet was as follows: 60 %, linoleic acid (18:2n-6), 0.29 % of total (n-3), 29.31 % of monounsaturated fatty acids (largely 18:1) and 9 % of saturated fatty acids. Total oil represented 5% of the diet. The DHA-enriched diet contained 3% of Omegavie DHA90 TG<sup>®</sup> oil and 2% of sunflower oil. The fatty acid composition of DHA enriched diet was as follows: 45.29 %, n-3 PUFA (i.e., 44.15 % DHA, 1.17 % EPA), 31.5 %, linoleic acid (18:2 n-6), 15 % of monounsaturated fatty acids (largely 18:1) and 6.35 % of saturated fatty acids. Omegavie DHA90 TG<sup>®</sup> was tightly sealed under a stream of nitrogen to avoid lipid oxidation and kept at 4°C. Diets were prepared every day, and the mice consumed them ad libitum. Uneaten food was discarded; food cups and water bottles were washed frequently.

## Supplemental Figure 2

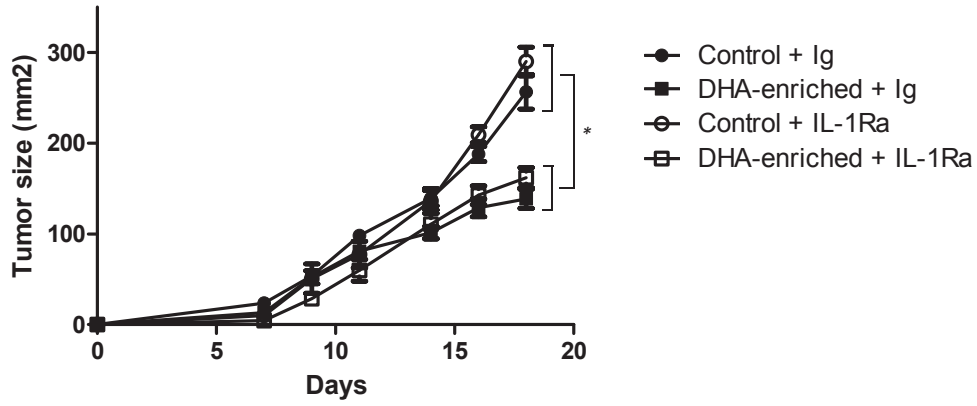


### Supplemental Figure 3

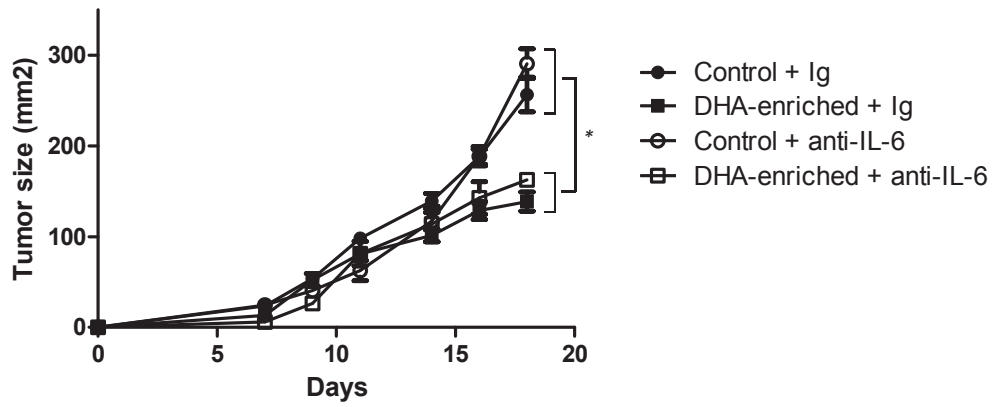


# Supplemental Figure 4

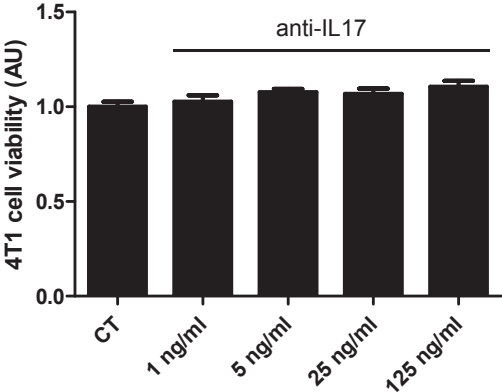
## B16F10 + IL-1Ra or Ig in C57BL/6



## B16F10 + anti-IL-6 or Ig in C57BL/6



Supplemental Figure 5

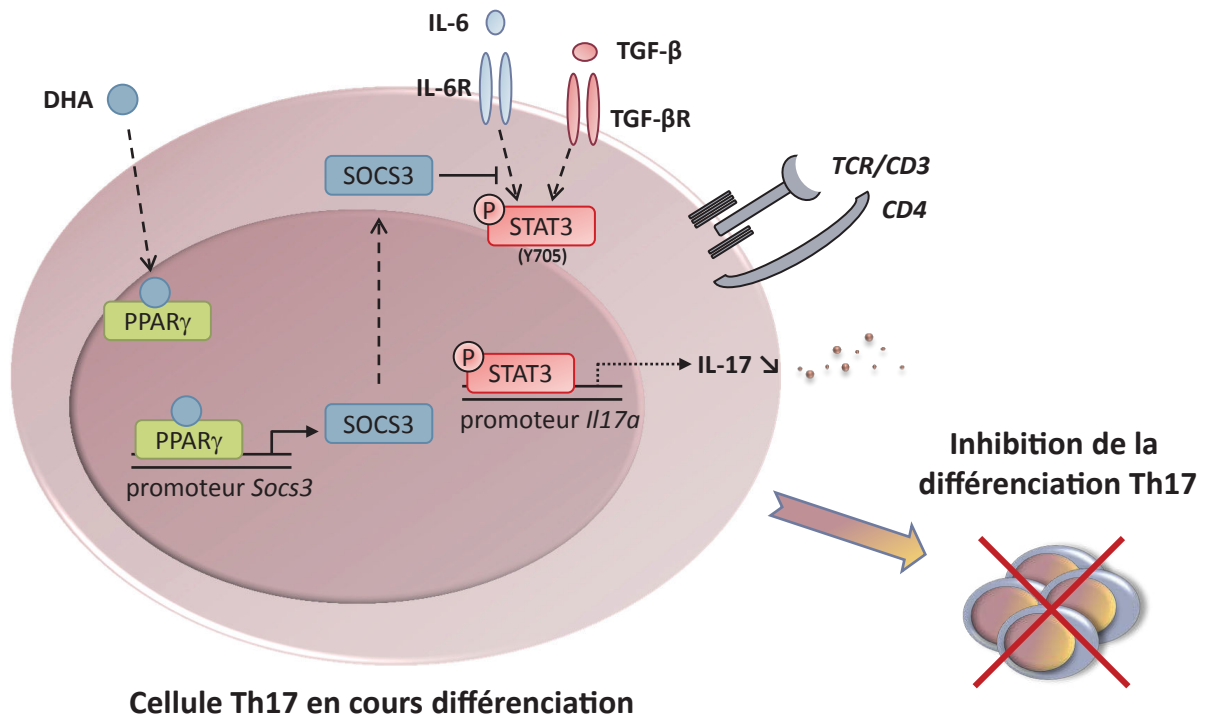


## Conclusion

Ce travail de recherche a permis :

- ✓ de déchiffrer les mécanismes moléculaires responsables de l'inhibition directe de la différenciation cellulaire Th17 par le DHA,
- ✓ de mettre en évidence un des effets anticancéreux du DHA médié par sa capacité à inhiber la sécrétion d'IL-17 par les cellules T CD4.

Nous avons ainsi caractérisé l'un des mécanismes impliqués dans le potentiel anticancéreux du DHA dépendant de sa capacité à moduler l'activité des lymphocytes T CD4. Ainsi, l'impact immunomodulateur du DHA a permis de restaurer une réponse immunitaire antitumorale efficace.



**Figure 16.** Influence du DHA sur la différenciation lymphocytaire Th17.

## II. Article 2

« The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of Th9 cells. »

Au début de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de collaborer sur le sujet d'étude du Dr Frédérique Végran. Les recherches qu'elles menaient dans l'équipe visaient à investiguer le rôle d'IRF1 dans la polarisation cellulaire Th9 sous l'effet de l'interleukine 1 $\beta$ . Ce travail a été publié dans la revue *Nature Immunology* en juin 2014. Dans ce projet, mon travail a principalement consisté à réaliser des différenciations cellulaires T CD4 *ex vivo* et les analyses relatives à la caractérisation des cellules générées, RT-PCR, tests ELISA, techniques de cytométrie et marquage intracellulaire, notamment. J'ai également participé à la mise en œuvre des protocoles d'expérimentation animale (transferts cellulaires adoptifs et schéma de déplétion, suivi de croissance). Ce travail en étroite collaboration avec le Dr Végran a permis de répéter les expériences de façon expérimentateur-indépendant.

Au début de ce travail, le criblage de cytokines pro-inflammatoires sur la différenciation Th9 a révélé que l'IL-1 $\beta$  augmentait la synthèse d'IL-9, IL-10 et IL-21 par ces cellules (Suppl. Figures 1a-b, Figures 1b, e). Une analyse par RNAseq a permis d'observer une induction très précoce du facteur de transcription IRF1 dans les lymphocytes Th9 induits en présence d'IL-1 $\beta$  (Figure 1a). Ces résultats ont été confirmés par qPCR et Western Blot (Figures 1b-d). L'inhibition de l'expression d'IRF1 au moyen d'un siRNA et l'utilisation de cellules issues de souris IRF1<sup>-/-</sup> ont validé l'implication d'IRF1 dans l'induction de la polarisation Th9 en présence d'IL-1 $\beta$  (Suppl. Figure 3, Figure 1e). Enfin, IRF1 renforce la polarisation Th9 sans induire leur conversion en un autre sous-type lymphocytaire (Suppl. Figures 1c-e).

D'un point de vue mécanistique, des analyses d'immuno-précipitation de la chromatine ont établi qu'IRF1 était capable de se fixer aux régions promotrices d'*IL9* et d'*IL21* pour induire l'expression de ces gènes (Figures 2a-b). Ces résultats ont été validés par des expériences de gènes rapporteurs et finalement confirmé grâce à l'infection rétrovirale de cellules T CD4 avec un vecteur sur-exprimant IRF1 (Figures 2c-d). Le recours à de nombreux modèles murins transgéniques a permis d'étudier finement la signalisation en aval de l'IL-1 $\beta$  responsable de l'induction d'IRF1 et a conduit à la caractérisation de la voie IL-1 $\beta$ >IL-1R1>Myd88>Fyn>STAT1



(Figure 3). En effet, en l'absence de l'un des protagonistes, l'IL-1 $\beta$  n'a plus d'effet sur le profil Th9. De plus, nous avons constaté que l'induction des Th9 en présence d'IL-1 $\beta$  s'accompagnait d'une phosphorylation de STAT1 sur son résidu Tyr 701 (alors que la phosphorylation de la sérine 727 est induite par le signal du TCR). Ainsi, STAT1 peut se fixer sur le promoteur d'*Irf1* et exercer son action transactivatrice (Figure 3f).

L'activité antitumorale des cellules Th9 induites en présence d'IL-1 $\beta$  a ensuite été examinée. Après génération *ex vivo* de cellules Th9 classiques ou différenciées en présence d'IL-1 $\beta$  issues de souris OTII (lymphocytes T CD4 exprimant un TCR transgénique reconnaissant l'ovalbumine), ces cellules ont été injectées par voie intraveineuse à des souris porteuses de tumeurs B16-OVA sous-cutanées ou au niveau pulmonaire. Nos résultats indiquent que les Th9 ont un effet antitumoral majeur et nettement supérieur à celui des Th9 (Figures 5a, c-d). Ces résultats ont été confirmés dans d'autres modèles tumoraux induits mais également dans le modèle de tumeurs spontanées MT-ret sur-exprimant le proto-oncogène RET et donc prédisposées à une forme agressive de mélanome uvéal capable de dissémination métastatique cutanée (Figures 5g-i). Bien que l'effet antitumoral des Th9 ait été décrit comme dépendant de l'IL-9, l'utilisation d'anticorps neutralisants dans les schémas de transferts adoptifs a indiqué que l'activité anticancéreuse des cellules Th9 induites sous l'influence de l'IL-1 $\beta$  dépendait de l'IL-21 (Figure 6). De plus, l'IL-21 est une molécule largement connue pour promouvoir les réponses antitumorales. Conformément aux données de la littérature, nous constatons que l'IL-21 favorise les fonctions des cellules NK et CD8 (Figures 6d-e). Finalement, l'implication d'IRF1 dans les fonctions antitumorales des lymphocytes Th9 induits en présence d'IL-1 $\beta$  a été validée par le transfert de cellules déficientes pour IRF1 ou sur-exprimant IRF1 après infection rétrovirale (Figure 7).

# The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of T<sub>H</sub>9 cells

Frédérique Végran<sup>1,2,10</sup>, Hélène Berger<sup>1,2,10</sup>, Romain Boidot<sup>3</sup>, Grégoire Mignot<sup>1,2</sup>, Mélanie Bruchard<sup>1,2</sup>, Magalie Dosset<sup>1,2</sup>, Fanny Chalmin<sup>1,2</sup>, Cédric Rébé<sup>1-3</sup>, Valentin Dérangère<sup>1,2</sup>, Bernhard Ryffel<sup>4,5</sup>, Masashi Kato<sup>6</sup>, Armelle Prévost-Blondel<sup>7-9</sup>, François Ghiringhelli<sup>1-3,11</sup> & Lionel Apetoh<sup>1-3,11</sup>

The T<sub>H</sub>9 subset of helper T cells was initially shown to contribute to the induction of autoimmune and allergic diseases, but subsequent evidence has suggested that these cells also exert antitumor activities. However, the molecular events that account for their effector properties are elusive. Here we found that the transcription factor IRF1 enhanced the effector function of T<sub>H</sub>9 cells and dictated their anticancer properties. Under T<sub>H</sub>9-skewing conditions, interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induced phosphorylation of the transcription factor STAT1 and subsequent expression of IRF1, which bound to the promoters of *IL9* and *IL21* and enhanced secretion of the cytokines IL-9 and IL-21 from T<sub>H</sub>9 cells. Furthermore, IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells exerted potent anticancer functions in an IRF1- and IL-21-dependent manner. Our findings thus identify IRF1 as a target for controlling the function of T<sub>H</sub>9 cells.

Since the original classification of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes into T helper type (T<sub>H</sub>1) and T<sub>H</sub>2 subsets<sup>1</sup>, the repertoire of CD4<sup>+</sup> T cell subsets has expanded to include additional effector T cell subsets, such as T<sub>H</sub>17 cells<sup>2</sup>, follicular helper T cells<sup>3</sup> and regulatory T cells expressing the transcription factor Foxp3 (ref. 4). The relevance of these subtypes of CD4<sup>+</sup> T cells has been documented in various immunopathological conditions such as inflammatory diseases and cancer<sup>2-4</sup>. Interleukin 9 (IL-9)-producing CD4<sup>+</sup> helper T cells (T<sub>H</sub>9 cells) were identified as a subset of CD4<sup>+</sup> helper T cells that are proinflammatory *in vivo*<sup>5,6</sup>. T<sub>H</sub>9 cells arise from reprogrammed T<sub>H</sub>2 cells stimulated with transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>5,6</sup>. Mouse and human T<sub>H</sub>9 cells secrete IL-9 and IL-21 and have been proposed to contribute to the development of autoimmune and allergic diseases<sup>7-9</sup>. However, despite these seminal findings, the transcriptional program that defines T<sub>H</sub>9 cell development is incompletely understood. The transcription factors IRF4 and PU.1 are essential for the development of T<sub>H</sub>9 cells, but these transcription factors do not specify T<sub>H</sub>9 cells, since IRF4 and PU.1 are involved in the differentiation of T<sub>H</sub>2 cells and T<sub>H</sub>17 cells, as well as the differentiation of macrophages and B cells, respectively<sup>10,11</sup>.

T<sub>H</sub>9 cells have been proposed to have anticancer properties in mice<sup>12,13</sup>. The transfer of antigen-specific T<sub>H</sub>9 cells prevents tumor outgrowth in the B16 melanoma cancer model, and T<sub>H</sub>9 cells have anticancer activity superior to that of T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and T<sub>H</sub>17 cells<sup>12</sup>. The release of IL-9 is proposed to account for the anticancer efficacy of T<sub>H</sub>9 cells. While such studies have provided an impetus for further investigation of the potential role of T<sub>H</sub>9 cells in controlling tumor

growth, the series of molecular events that confer anticancer properties onto T<sub>H</sub>9 cells remain unclear. Whether other effector cells of the immune system also contribute to the anticancer efficacy of T<sub>H</sub>9 cells also remains elusive.

The activation of antigen-presenting cells by pathogens or damage-associated molecular pattern molecules released by stressed and/or damaged cells triggers the release of inflammatory mediators such as the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$ , which can create a chronically inflammatory milieu that supports carcinogenesis and tumor progression. However, IL-1 $\beta$  can also support the activation of CD8<sup>+</sup> T cells in the setting of anticancer immune responses triggered by chemotherapy, which suggests that IL-1 $\beta$  exerts contrasting effects depending on the immunological context<sup>14</sup>. IL-1 $\beta$  is also known to alter the quality of CD4<sup>+</sup> T cell responses, as indicated by the enhanced secretion of IL-17 from T<sub>H</sub>17 cells in presence of IL-1 $\beta$ <sup>15</sup>. Similarly, IL-1 $\beta$  has also been shown to enhance the secretion of IL-9 from T<sub>H</sub>9 cells, but the underlying mechanisms of this have not been explored<sup>16</sup>. The functional consequences of this observation have also not been documented.

Here we found that the ability of IL-1 $\beta$  to enhance the secretion of cytokines from T<sub>H</sub>9 cells relied on the transcription factor IRF1. In developing T<sub>H</sub>9 cells, IL-1 $\beta$  drove transcription factor STAT1-dependent expression of IRF1, which enhanced the secretion of IL-9, IL-10 and IL-21 by T<sub>H</sub>9 cells. Furthermore, the adoptive transfer of IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells into mice bearing melanoma or lung adenocarcinoma tumors resulted in potent anticancer effects that depended on the expression of IRF1 and IL-21 by T<sub>H</sub>9 cells. Our data suggest

<sup>1</sup>INSERM, U866, Dijon, France. <sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, Dijon, France. <sup>3</sup>Centre Georges François Leclerc, Dijon, France. <sup>4</sup>CNRS and University, UMR7355, Orléans, France. <sup>5</sup>Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, South Africa. <sup>6</sup>Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi, Japan. <sup>7</sup>CNRS, UMR 8104, Paris, France. <sup>8</sup>INSERM, U1016, Paris, France. <sup>9</sup>Paris Descartes University, Cochin Institute, Paris, France. <sup>10</sup>These authors contributed equally to this work. <sup>11</sup>These authors jointly supervised this work. Correspondence should be addressed to F.G. (fghiringhelli@cgfl.fr) or L.A. (lionel.apetoh@inserm.fr).

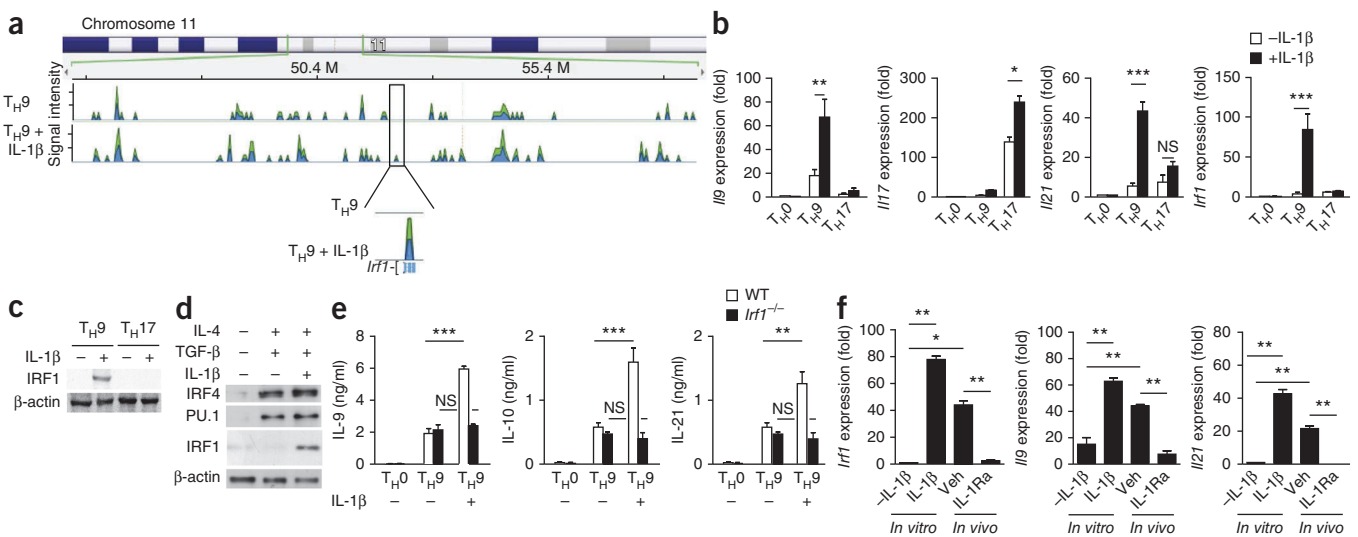
that in inflammatory situations, IRF1 controls the effector functions of  $T_H9$  cells and dictates their anticancer properties.

## RESULTS

### IL-1 $\beta$ induces IRF1 expression in $T_H9$ cells

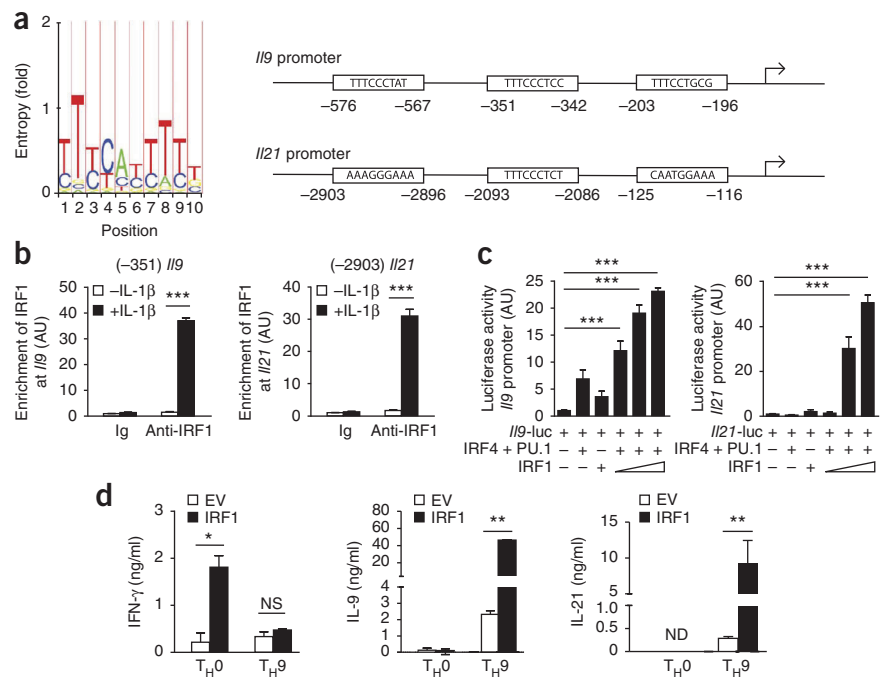
To address the influence of proinflammatory mediators on  $T_H9$  polarization, we differentiated naive mouse  $CD4^+$  T cells into  $T_H9$  cells through the use of TGF- $\beta$  and IL-4 in the presence of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 or IL-33. We found that IL-1 $\beta$  enhanced expression of the  $T_H9$ -related cytokines IL-9, IL-10 and IL-21, but IL-1 $\alpha$ , IL-18 and IL-33 did not (**Supplementary Fig. 1a,b**).  $T_H9$  cells that had been differentiated with TGF- $\beta$  and IL-4 in the presence of IL-1 $\beta$  expressed genes encoding the  $T_H9$ -related transcription factors IRF4 (*Irf4*) and PU.1 (*Spi1*) but lacked expression of the  $T_H1$ -,  $T_H2$ - or  $T_H17$ -related transcription factors T-bet (*Tbx21*), GATA-3 (*Gata3*) and ROR $\gamma$ t (*Rorc*), and they did not secrete interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) or IL-17A or express *Il4* mRNA (**Supplementary Fig. 1c-e**); this demonstrated that IL-1 $\beta$  reinforced but did not skew  $T_H9$  differentiation. We used RNA sequencing to analyze naive  $CD4^+$  T cells that had been differentiated into  $T_H9$  cells with TGF- $\beta$  and IL-4 in the presence or absence of IL-1 $\beta$ . The addition of IL-1 $\beta$  to cultures of developing  $T_H9$  cells did not substantially alter their transcript expression profile (**Supplementary Fig. 2 and Supplementary Table 1**), which indicated that the addition of IL-1 $\beta$  did not globally affect  $T_H9$  differentiation. However, we noted that expression of the gene encoding IRF1 (*Irf1*), a  $T_H1$ -related transcription factor<sup>17,18</sup>, was specifically induced shortly after stimulation of  $T_H9$  cells in the presence of IL-1 $\beta$  (**Fig. 1a**). Quantitative PCR and immunoblot analysis confirmed higher expression

of *Irf1* mRNA and IRF1 protein in developing  $T_H9$  cells induced in the presence of IL-1 $\beta$  than in those induced in its absence, but not in their  $T_H17$  counterparts (**Fig. 1b-d**). To determine the role of *Irf1* in  $T_H9$  cells, we differentiated naive *Irf1*-deficient  $CD4^+$  T cells into  $T_H9$  cells with or without IL-1 $\beta$ . While *Irf1*-deficient  $CD4^+$  T cells were not intrinsically impaired in their ability to secrete IL-9, IL-10 or IL-21 under  $T_H9$ -skewing conditions compared with the secretion of those cytokines from wild-type cells, IL-1 $\beta$  failed to enhance cytokine expression by differentiating  $T_H9$  cells in absence of *Irf1* (**Fig. 1e**). We obtained similar results after downregulating *Irf1* expression with small interfering RNA (siRNA) or cyanidin 3-glucoside, a natural compound that had been shown to prevent *Irf1* expression elicited by inflammatory signals<sup>19</sup> (**Supplementary Fig. 3**); this confirmed the proposal that IRF1 mediated the effects of IL-1 $\beta$  in  $T_H9$  cells. To test the relevance of our observations *in vivo*, we first investigated *Irf1* expression in  $T_H9$  cells isolated from mice bearing B16-F10 mouse melanoma tumors, in which the presence of  $T_H9$  cells has been noted<sup>12</sup>. For this, we injected B16-F10 cells intravenously into wild-type mice and then sorted  $T_H9$  cells from tumor-bearing mice on the basis of their expression of chemokine receptors<sup>20</sup>. As reported before<sup>20</sup>,  $CD4^+CCR3^+CCR6^+CXCR3^+$   $T_H9$  cells expressed *Il9* mRNA but not *Irfng* mRNA or *Il17* mRNA (**Supplementary Fig. 4**). Notably, we found that  $T_H9$  cells isolated from B16-F10 tumor-bearing mice had higher expression of *Irf1*, *Il9* and *Il21* mRNA than did conventionally differentiated  $T_H9$  cells (that is, those derived *in vitro* without IL-1 $\beta$ ) (**Fig. 1f**). To determine whether this observation was attributable to the presence of IL-1 $\beta$  *in vivo*, we treated B16-F10 tumor-bearing mice with an antagonist to the receptor for IL-1 (IL-1R)



**Figure 1** IRF1 controls the secretion of  $T_H9$ -related cytokines. **(a)** RNA-sequencing analysis of genes on chromosome 11 (top row) in  $T_H9$  cells differentiated for 1 h from sorted naive  $CD4^+CD62L^{hi}CD44^{lo}$  T cells with (bottom row) or without (middle row) IL-1 $\beta$  in the presence of anti-CD3 and anti-CD28; signal intensity is presented as the sum of two separate 'reads' (blue and green). M, megabases (position on chromosome 11). Below, enlargement of *Irf1* region, showing its expression in both conditions (blue vertical rectangles indicate the *Irf1* reference sequence (exon-intron)). **(b)** RT-PCR analysis of *Il9*, *Il17*, *Il21* and *Irf1* mRNA in  $T_H0$ ,  $T_H9$  or  $T_H17$  cells differentiated for 48 h (*Il9*, *Il17* and *Il21*) or 1 h (*Irf1*) relative to naive  $CD4^+$  T cells with (+) or without (-) IL-1 $\beta$ ; results were normalized to the expression of mouse *Actb* (encoding  $\beta$ -actin) and are presented relative to those of control  $T_H0$  cells differentiated without IL-1 $\beta$ . **(c)** Immunoblot analysis of IRF1 in  $T_H9$  or  $T_H17$  cells differentiated for 24 h from naive  $CD4^+$  T cells with or without IL-1 $\beta$ ;  $\beta$ -actin serves as a loading control throughout. **(d)** Immunoblot analysis of IRF1, IRF4 and PU.1 in cells differentiated for 24 h from naive  $CD4^+$  T cells in the presence (+) or absence (-) of IL-4, TGF- $\beta$  and/or IL-1 $\beta$  (above lanes). **(e)** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IL-9, IL-10 and IL-21 in supernatants of  $T_H0$  cells or  $T_H9$  cells differentiated for 3 d from wild-type (WT) or *Irf1*<sup>-/-</sup> naive  $CD4^+$  T cells with or without IL-1 $\beta$ . **(f)** RT-PCR analysis of *Irf1*, *Il9* and *Il21* in  $T_H9$  cells induced *in vitro* with or without IL-1 $\beta$  (*In vitro*) and in  $CCR3^+CXCR3^+CCR6^+CCR4^-CD4^+$  T cells sorted from the tumor-draining lymph nodes of wild-type mice 8 d after intravenous injection of B16-F10 melanoma cells and treatment with IL-1R antagonist (IL-1Ra) or Vehicle (Veh) (*In vivo*); results normalized as in **b** and presented relative to those of  $T_H0$  cells, set as 1. NS, not significant; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  (Mann-Whitney test (**b,e**) or Kruskal-Wallis test (**f**)). Data are from one experiment representative of at least two independent experiments with similar results (mean and s.e.m. of triplicates (**b,e**) or three biological replicates (**f**)).

**Figure 2** IRF1 binds to the promoters of *Il9* and *Il21* in  $T_H9$  cells. **(a)** Bioinformatics analysis (left) identifying the consensus sequence of IRF1-binding sites (boxes, right) in the promoters of mouse *Il9* and *Il21*; numbers below diagrams (right) indicate position relative to the transcription start site (arrows, far right). **(b)** ChIP analysis of the binding of IRF1 to the putative binding site at position  $-351$  of the *Il9* promoter (left) and position  $-2903$  of the *Il21* promoter (right) in  $T_H9$  cells differentiated *in vitro* with or without IL-1 $\beta$ ; results obtained with anti-IRF1 are presented in arbitrary units (AU) relative to those obtained with control immunoglobulin (Ig) (isotype-matched control antibody) in cells not treated with IL-1 $\beta$ . **(c)** Firefly luciferase activity in 3T3 cells given transfection of luciferase reporter constructs for the *Il9* promoter (*Il9*-luc) or *Il21* promoter (*Il21*-luc) together with various combinations of vectors encoding IRF4 and PU.1 plus 0  $\mu$ g (–) or 5  $\mu$ g (+) or increasing doses (1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g and 5  $\mu$ g; wedge) of a vector for the overexpression of IRF1, assessed 24 h later and presented relative to the activity of a cotransfected control renilla luciferase reporter. **(d)** Release of IFN- $\gamma$ , IL-9 and IL-21 from GFP $^+$  cells sorted from naive CD4 $^+$  T cells 2 d after retroviral infection with empty vector expressing GFP alone (EV) or GFP plus overexpression of IRF1 (IRF1) and differentiated for 3 d into  $T_H0$  or  $T_H9$  cells. ND, not detected. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  (Mann-Whitney test (b,d) or Kruskal-Wallis test (c)). Data are from one experiment representative of three independent experiments with similar results (mean and s.e.m. of three triplicates in b–d).



and assessed gene expression in sorted  $T_H9$  cells; we found that treatment with the IL-1R antagonist reduced their expression of *Irf1*, *Il9* and *Il21* (Fig. 1f). Collectively, these findings indicated that IL-1 $\beta$  drove the expression of IRF1 in  $T_H9$  cells, which resulted in enhanced expression of  $T_H9$  cell cytokines.

### IRF1 controls the expression of *Il9* and *Il21* in $T_H9$ cells

Bioinformatics analysis identified three putative binding sites for IRF1 on the promoters of *Il9* and *Il21* (Fig. 2a). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) demonstrated binding of IRF1 to the *Il9* promoter or *Il21* promoter at position  $-351$  or  $-2903$ , respectively, in  $T_H9$  cells induced with IL-1 $\beta$  (Fig. 2b). Luciferase assays of 3T3 mouse fibroblasts further emphasized the finding that IRF1 was able to transcriptionally dictate the transcription of *Il9* and *Il21*, as overexpression of IRF1 in the presence of IRF4 and PU.1 further augmented the activity of the *Il9* promoter and *Il21* promoter in a dose-dependent manner (Fig. 2c). To further investigate the function of IRF1 in  $T_H9$  development, we retrovirally infected CD4 $^+$  T cells with a control vector expressing green fluorescent protein (GFP) alone or a vector expressing GFP along with overexpression of IRF1 and differentiated the cells by stimulation with antibody to the invariant signaling protein CD3 (anti-CD3) and antibody to the coreceptor CD28 (anti-CD28) in the absence of differentiating cytokines ( $T_H0$  conditions) or with TGF- $\beta$  and IL-4 ( $T_H9$  conditions). Notably, while IRF1 expression in  $T_H0$  cells promoted their secretion of IFN- $\gamma$ , IRF1 expression in  $T_H9$  cells substantially enhanced their secretion of IL-9 and IL-21 without skewing them into IFN- $\gamma$ -secreting cells (Fig. 2d); this demonstrated the specific ability of IRF1 to enhance the effector function of  $T_H9$  cells under  $T_H9$ -polarizing conditions.

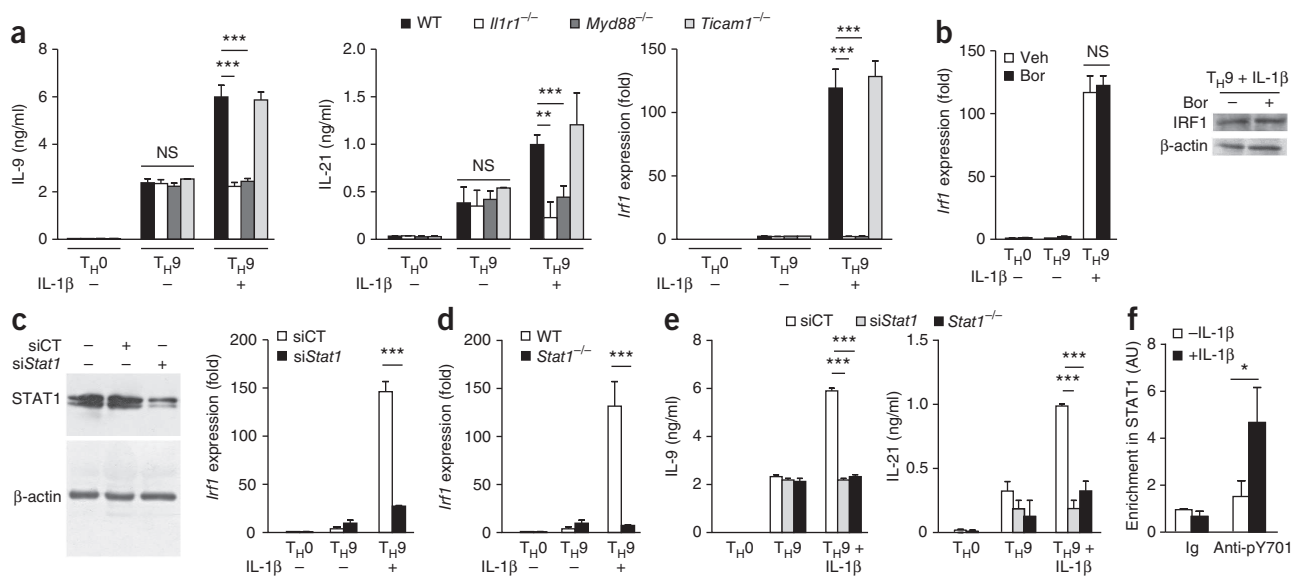
### STAT1 induces *Irf1* in $T_H9$ cells

IL-1 $\beta$  signals through IL-1R1 and the adaptor MyD88, which transduces upstream signals from IL-1R2 $^1$ . Accordingly, we found that IL-1 $\beta$  was

unable to enhance production of the cytokines IL-9 and IL-21 or *Irf1* expression by  $T_H9$  cells in the absence of MyD88 or IL-1R1 (Fig. 3a). However, absence of the adaptor TRIF, which is downstream of endosomal receptors such as Toll-like receptor 3 but is not downstream of IL-1R1, did not compromise the ability of IL-1 $\beta$  to enhance the secretion of  $T_H9$ -related cytokines (Fig. 3a). Since the MyD88 signal-transduction pathway is known to drive activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B $^{22}$ , we assessed the contribution of NF- $\kappa$ B signaling in the IL-1 $\beta$ -driven enhancement of  $T_H9$  cell functions. However, we found that inhibition of NF- $\kappa$ B with the proteasome inhibitor bortezomib did not prevent *Irf1* expression or the expression of  $T_H9$ -related cytokines induced by IL-1 $\beta$  (Fig. 3b and Supplementary Fig. 5a). STAT1 acts as a transcriptional activator of *Irf1* in response to cytokines $^{23}$ . We found that disruption of *Stat1* expression abolished the ability of IL-1 $\beta$  to induce *Irf1* expression in  $T_H9$  cells (Fig. 3c,d). In addition, IL-1 $\beta$  failed to enhance the expression of IL-9 or IL-21 in  $T_H9$  cells in the absence of STAT1 (Fig. 3e). Finally, to further establish a connection between *Irf1* expression and STAT1, we induced  $T_H9$  cells with or without IL-1 $\beta$  and analyzed the cells by ChIP. We found that STAT1 bound to the *Irf1* promoter (Fig. 3f), which further demonstrated that IL-1 $\beta$  induced IRF1 expression via STAT1. Together these results indicated that IL-1 $\beta$  drove *Irf1* expression in  $T_H9$  cells and enhanced their secretion of IL-9 and IL-21 via the activation of STAT1.

### The tyrosine kinase Fyn phosphorylates STAT1 in $T_H9$ cells

Phosphorylation of STAT1 at Ser727 promotes its transcriptional activity and enhances the expression of selected genes $^{24}$ . Phosphorylation of STAT1 at Tyr701 promotes the dimerization of STAT1 and its subsequent translocation to the nucleus and is thus required for the transcriptional activity of STAT1 (ref. 25). We found constitutive phosphorylation of STAT1 at Ser727 in  $T_H9$  cells (Fig. 4a). In contrast, phosphorylation of STAT1 at Tyr701 was induced by IL-1 $\beta$  in differentiating  $T_H9$  cells within 6 min of the



**Figure 3** IL-1 $\beta$ -induced *Irf1* expression in T<sub>H9</sub> cells relies on MyD88-dependent activation of STAT1. (a) ELISA of IL-9 (left) and IL-21 (middle) in T<sub>H0</sub> or T<sub>H9</sub> cells differentiated for 3 d from naive wild-type, *Il1r1*<sup>-/-</sup>, MyD88-deficient (*Myd88*<sup>-/-</sup>) or TRIF-deficient (*Ticam1*<sup>-/-</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells with or without IL-1 $\beta$ ; right, quantitative PCR analysis of *Irf1* expression after 1 h of such differentiation (results normalized as in Fig. 1b and presented relative to those of T<sub>H0</sub> cells differentiated without IL-1 $\beta$ ). (b) RT-PCR analysis of *Irf1* (left) and immunoblot analysis of IRF1 (right) in T<sub>H0</sub> or T<sub>H9</sub> cells differentiated for 1 h from naive CD4<sup>+</sup> T cells in the presence or absence of IL-1 $\beta$  with (Bor) or without (Veh) 10 nM bortezomib (RT-PCR results normalized as in Fig. 1b and presented relative to those of T<sub>H0</sub> cells differentiated without IL-1 $\beta$  or bortezomib). (c) Immunoblot analysis of STAT1 (left) and quantitative PCR analysis of *Irf1* (right) in T<sub>H0</sub> or T<sub>H9</sub> cells differentiated for 1 h, in the presence or absence of IL-1 $\beta$ , from wild-type naive CD4<sup>+</sup> T cells transfected with control siRNA (siCT) or *Stat1*-specific siRNA (siStat1) (PCR results normalized as in Fig. 1b and presented relative to those of T<sub>H0</sub> cells differentiated without IL-1 $\beta$  from CD4<sup>+</sup> T cells transfected with control siRNA). (d) Quantitative PCR analysis of *Irf1* in T<sub>H0</sub> or T<sub>H9</sub> cells differentiated for 1 h from wild-type or *Stat1*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in the presence or absence of IL-1 $\beta$  (normalized as in Fig. 1b and presented relative to those of T<sub>H0</sub> cells differentiated from wild-type CD4<sup>+</sup> T cells without IL-1 $\beta$ ). (e) ELISA of IL-9 and IL-21 in supernatants of T<sub>H0</sub> or T<sub>H9</sub> cells differentiated for 3 d, with or without IL-1 $\beta$ , from wild-type naive CD4<sup>+</sup> T cells transfected with siRNA as in c or from *Stat1*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. (f) ChIP analysis of the binding of STAT1 phosphorylated at Tyr701 (pY701) to the putative binding site at position -128 of the *Irf1* promoter in T<sub>H9</sub> cells differentiated for 1 h from wild-type CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro* with or without IL-1 $\beta$ ; results are presented relative to those obtained with control immunoglobulin in cells differentiated without IL-1 $\beta$ . \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001 (Kruskal-Wallis test (a,e) or Mann-Whitney test (b-d,f)). NS, not significant. Data are from one experiment representative of at least two independent experiments with similar results (mean and s.e.m. of three triplicates).

induction of differentiation (Fig. 4a,b). This event was dependent on signaling via IL-1R, since STAT1 Tyr701 was not phosphorylated in *Il1r1*<sup>-/-</sup> T<sub>H9</sub> cells differentiated with IL-1 $\beta$  (Fig. 4c). We next searched for the intracellular signaling events responsible for the phosphorylation of STAT1 after the addition of IL-1 $\beta$  during T<sub>H9</sub> differentiation. MyD88-dependent signaling leads to the activation of NF- $\kappa$ B and of the kinases TAK1 and PI(3)K, as well as of the tyrosine kinases c-Src and Fyn<sup>26</sup>. We found that inhibition of Fyn substantially diminished the phosphorylation of STAT1 during the induction of T<sub>H9</sub> cells in the presence of IL-1 $\beta$ , but inhibition of c-Src, NF- $\kappa$ B, TAK1 or PI(3)K did not (Fig. 4d). In line with that finding, blocking Fyn expression or Fyn activity through the use of siRNA or chemical inhibition, respectively, abrogated the ability of IL-1 $\beta$  to induce *Irf1* expression in T<sub>H9</sub> cells and their secretion of IL-9 and IL-21 (Fig. 4e,f and Supplementary Fig. 5b). Together these data indicated that in developing T<sub>H9</sub> cells, IL-1 $\beta$  induced phosphorylation of STAT1 at Tyr701 through the IL-1R1-MyD88 pathway, which resulted in enhanced expression of *Irf1* and secretion of T<sub>H9</sub>-related cytokines.

#### IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H9</sub> cells exhibit high antitumor activity

Since IL-1 $\beta$  enhances the secretion of T<sub>H9</sub>-related cytokines, we hypothesized that it might also affect the anticancer properties of T<sub>H9</sub> cells. To test this, we differentiated naive OT-II CD4<sup>+</sup> T cells into T<sub>H1</sub> cells, and also differentiated them into T<sub>H17</sub> cells and T<sub>H9</sub> cells with or without IL-1 $\beta$ . OT-II CD4<sup>+</sup> T cells have transgenic expression of a

T cell antigen receptor (TCR) that recognizes an epitope of residues 323–339 of ovalbumin (OVA) in the context of the major histocompatibility complex class II molecule I-A<sup>b</sup>. We transferred the differentiated OT-II helper T cells intravenously into syngeneic immunocompetent wild-type mice that we challenged intravenously on the same day with B16 melanoma cells expressing full-length OVA (B16-OVA). We found that IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H9</sub> cells exerted an anticancer effect superior to that of T<sub>H1</sub> cells, T<sub>H17</sub> cells induced with or without IL-1 $\beta$ , and conventionally differentiated T<sub>H9</sub> cells (Fig. 5a). We obtained similar results in the Lewis lung adenocarcinoma tumor model through the use of OVA-expressing mouse Lewis lung carcinoma cells (LLC-OVA cells), as well as with established B16-OVA tumor cells implanted subcutaneously (Fig. 5b-d). We further found that the anticancer effect of IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H9</sub> cells was synergistic with chemotherapy with cyclophosphamide; this combined therapy led to complete tumor regression in 40% of mice (Supplementary Fig. 6).

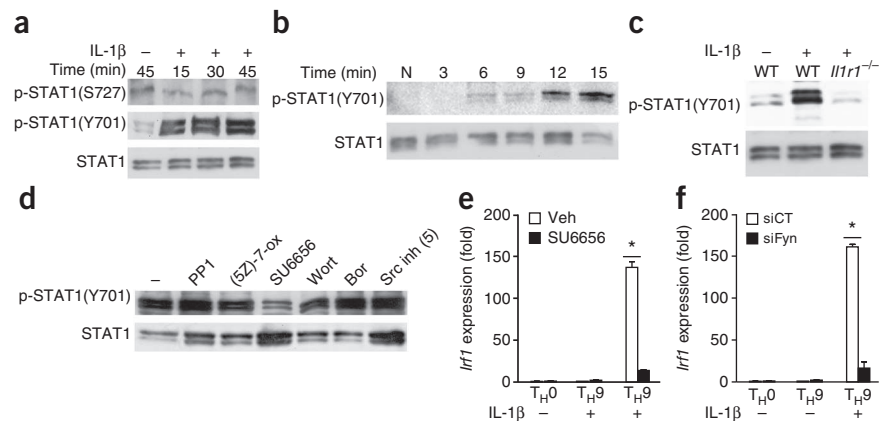
IL-1 $\beta$  has contrasting roles on tumor growth *in vivo*. We thus assessed *in vivo* its effect on the anticancer activity of conventionally differentiated T<sub>H9</sub> cells. For this, we transferred B16-OVA cancer cells, along with conventionally differentiated T<sub>H9</sub> cells derived from OT-II mice, into wild-type mice given injection of recombinant IL-1 $\beta$ . While in the absence of the transfer of T<sub>H9</sub> cells, IL-1 $\beta$  favored the growth of B16-OVA tumors, it enhanced the anticancer activity of conventionally differentiated T<sub>H9</sub> cells *in vivo*, which resulted in the prevention of tumor growth (Supplementary Fig. 7). We then



**Figure 4** Phosphorylation of STAT1 at Tyr701

drives Fyn-dependent *Irf1* expression in  $T_H9$  cells. **(a)** Immunoblot analysis of STAT1 phosphorylated at Ser727 (p-STAT1(S727)) or Tyr701 (p-STAT1(Y701)) and total STAT1 in  $T_H9$  cells differentiated for 15–45 min (above lanes) from naive wild-type  $CD4^+$  T cells with or without IL-1 $\beta$ . **(b)** Immunoblot analysis of STAT1 phosphorylated at Tyr701 and total STAT1 in naive  $CD4^+$  T cells (N) and in  $T_H9$  cells differentiated for 3–15 min (above lanes) from naive  $CD4^+$  T cells with IL-1 $\beta$ . **(c)** Immunoblot analysis as in **b** of  $T_H9$  cells differentiated for 45 min from naive wild-type or *I1r1*<sup>-/-</sup>  $CD4^+$  T cells with or without IL-1 $\beta$ . **(d)** Immunoblot analysis as in **b** of  $T_H9$  cells differentiated for 1 h from naive wild-type  $CD4^+$

T cells in the presence of IL-1 $\beta$  without an inhibitor (–) or with the Lck inhibitor PP1 (6 nM), the TAK1 inhibitor 5Z-7-oxozeaenol ((5Z)-7-ox) (8 nM), the Fyn inhibitor SU6656 (170 nM), the PI(3)K inhibitor wortmannin (Wort) (5 nM), the NF- $\kappa$ B inhibitor bortezomib (Bor) (10 nM) or the c-Src inhibitor Src inh (5) (100 nM). **(e)** Quantitative RT-PCR analysis of *Irf1* in  $T_H0$  and  $T_H9$  differentiated for 1 h from naive  $CD4^+$  T cells in the presence or absence of IL-1 $\beta$  and with (SU6656) or without (Veh) 170 nM SU6656 (results normalized as in **Fig. 1b** and presented relative to those of  $T_H0$  cells differentiated without IL-1 $\beta$  or SU6656). **(f)** Quantitative RT-PCR analysis of *Irf1* in  $T_H0$  and  $T_H9$  differentiated for 1 h, in the presence or absence of IL-1 $\beta$ , from wild-type naive  $CD4^+$  T cells transfected with control or *Fyn*-specific siRNA (results normalized as in **Fig. 1b** and presented relative to those of  $T_H0$  cells differentiated without IL-1 $\beta$  from cells transfected with control siRNA). \**P* < 0.001 (Mann-Whitney test). Data are from one experiment representative of at least two independent experiments with similar results (mean and s.e.m. of three triplicates in **e,f**).



examined the fate of  $T_H9$  cells in tumor-bearing mice *in vivo* to assess their stability. For this, we transferred IL-1 $\beta$ -induced  $CD45.2^+$  OT-II  $T_H9$  cells into  $CD45.1^+$  mice bearing B16-OVA tumors. We sorted  $CD45.2^+$  cells from lung-draining lymph nodes and assessed their gene-expression profiles.  $CD45.2^+$  cells maintained their expression of  $T_H9$ -related genes (*Irf4*, *Spi1*, *Il9* and *Il21*) and did not gain expression of  $T_H1$ -related genes after transfer (**Fig. 5e,f** and **Supplementary Table 2**). These data indicated that IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells maintained their transcriptional program *in vivo*.

Next we examined the anticancer activity of IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells in non-OVA tumor models. First we obtained  $CD4^+$  T cells from mice with transgenic expression of a TCR that recognizes TRP-1, a melanocyte-differentiation antigen expressed by B16-F10 melanoma cells. We differentiated those  $CD4^+$  T cells into  $T_H9$  cells and found that IL-1 $\beta$  enhanced the anticancer efficacy of the  $T_H9$  cells against B16-F10 cancer cells injected intravenously into wild-type mice (**Fig. 5g**). We then replicated those results with established subcutaneous B16-F10 tumors and found that this treatment resulted in substantially improved mouse survival (**Fig. 5h**). Finally, we investigated the anticancer efficacy of IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells in a model of spontaneous melanoma. For this, we used mice expressing the human proto-oncogene *RET*, which encodes a receptor tyrosine kinase, under the control of the promoter of the gene encoding metallothionein (called 'MT-ret mice' here)<sup>27</sup>. These mice develop cutaneous metastases that result from dissemination of the primary uveal tumor<sup>28,29</sup>. Injection of either conventionally differentiated  $T_H9$  cells or IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells into MT-ret mice delayed development of the primary tumor relative to its development in untreated MT-ret mice (**Fig. 5i**). Nevertheless, only IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells inhibited the onset of cutaneous metastasis (**Fig. 5i**). Together these findings demonstrated that IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells were potent effector cells in the context of T cell-based anticancer therapy.

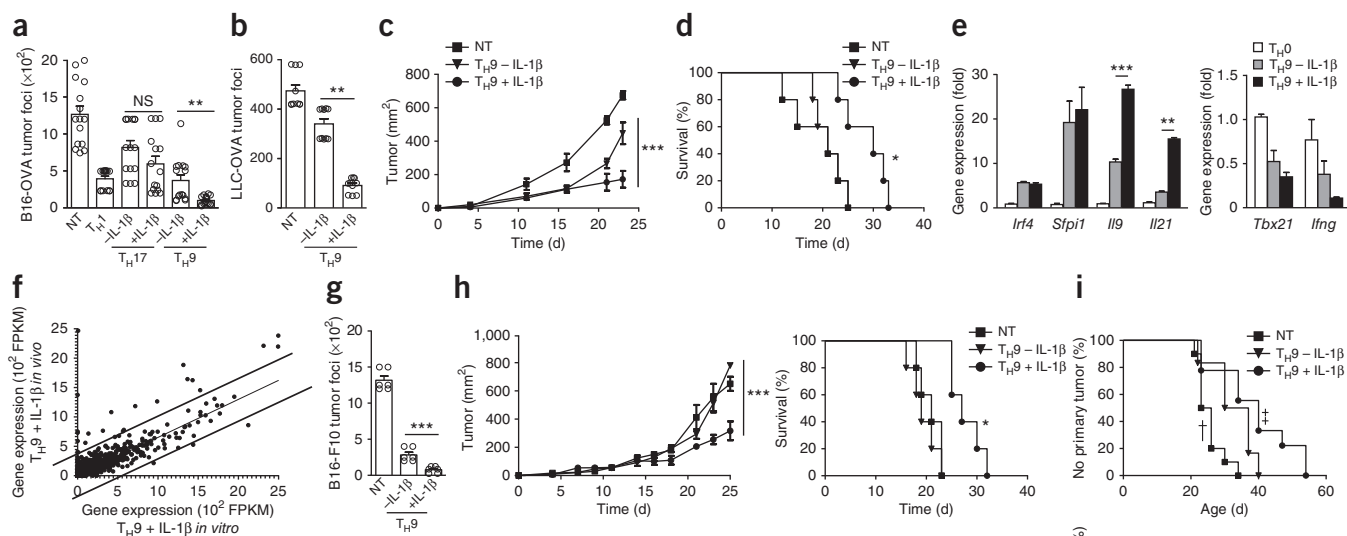
### The anticancer efficacy of IL-1 $\beta$ -induced $T_H9$ cells relies on IL-21

$T_H9$  cells induced with TGF- $\beta$  and IL-4 reportedly exert antitumor effects that rely on IL-9 (refs. 12,13). Since the addition of IL-1 $\beta$  to TGF- $\beta$  and IL-4 enhanced the secretion of IL-9, IL-10 and IL-21 by  $T_H9$  cells, we investigated the respective roles of these cytokines

in the antitumor effect of these cells. In line with the published observations<sup>12,13</sup>, neutralization of IL-9 inhibited the anticancer effect of  $T_H9$  cells (**Fig. 6a**). However, depletion of IL-9 did not affect the anticancer activity of IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells (**Fig. 6a**). Similarly, IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells retained an anticancer efficacy superior to that of conventionally differentiated  $T_H9$  cells in IL-9R-deficient mice (**Supplementary Fig. 8a**), which suggested that other factors contributed to their anticancer efficacy. Blockade of IL-10 with anti-IL-10 did not alter the antitumor functions of  $T_H9$  cells induced with or without IL-1 $\beta$  (**Fig. 6b**). In contrast, neutralization of IL-21 with anti-IL-21 completely abolished the anticancer properties of IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells (**Fig. 6c**). We obtained similar results with IL-21R-deficient mice (**Supplementary Fig. 8b**), which indicated a key role for IL-21 in tumor control. IL-21 has been shown to promote the activation of natural killer (NK) cells and  $CD8^+$  T cells<sup>30,31</sup>. Accordingly, we found that supernatants of IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells enhanced IFN- $\gamma$  production by either  $CD8^+$  T cells or NK cells *in vitro* in an IL-21-dependent manner (**Fig. 6d**). In addition, we found that depletion of  $CD8^+$  T cells or NK cells *in vivo* impaired the anticancer effect of IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells (**Fig. 6e**). IL-1 $\beta$ -induced OT-II  $T_H9$  cells failed to control tumor growth upon blockade of IFN- $\gamma$  *in vivo* or in IFN- $\gamma$ -deficient (*Ifng*<sup>-/-</sup>) mice, but IL-1 $\beta$ -induced *Ifng*<sup>-/-</sup> OT-II  $T_H9$  cells retained their anticancer properties in immunocompetent mice (**Fig. 6f-h**); this demonstrated that IFN- $\gamma$  produced by bystander cells, not IFN- $\gamma$  produced by  $T_H9$  cells, was required *in vivo*. IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells retained their anticancer properties in mast cell-deficient (*Ki1*<sup>W-sh</sup>) mice, mice treated with clodronate-containing liposomes and mice treated with anti-CD19 (**Supplementary Fig. 8c-e**); this ruled out the possibility of any involvement of mast cells, macrophages or B cells in the anticancer effect of  $T_H9$  cells. Collectively, these data supported the proposal that IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells mediated their antitumor effect via their ability to trigger IFN- $\gamma$  production by resident  $CD8^+$  T cells and NK cells in an IL-21-dependent manner.

### IRF1 expression dictates the anticancer efficacy of $T_H9$ cells

Since IRF1 accounted for the enhanced production of IL-21 by IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells, we aimed to determine the contribution of IRF1 to the anticancer effects of IL-1 $\beta$ -induced  $T_H9$  cells. We found that



**Figure 5** IL-1 $\beta$  endows T<sub>H</sub>9 cells with superior anticancer properties. (a) Lung tumor foci in wild-type mice 13 d after intravenous injection of B16-OVA melanoma cells without transfer of additional cells (no transfer (NT)) or together with effector OT-II T<sub>H</sub>1 cells (T<sub>H</sub>1) or T<sub>H</sub>17 or T<sub>H</sub>9 cells differentiated with or without IL-1 $\beta$ . (b) Lung tumor foci in wild-type mice 13 d after intravenous injection of LLC-OVA lung tumor cells alone or together with T<sub>H</sub>9 cells differentiated with or without IL-1 $\beta$ . (c, d) Tumor growth (c) and survival (d) of wild-type mice given subcutaneous injection of B16-OVA cells followed by no additional cell transfer or intravenous injection of  $2 \times 10^6$  OT-II effector T<sub>H</sub>9 cells differentiated with or without IL-1 $\beta$  5 and 10 d later. (e) RT-PCR analysis of T<sub>H</sub>9-related genes (left) and T<sub>H</sub>1-related genes (right) in CD45.2<sup>+</sup> OT-II cells sorted from tumor-draining lymph nodes of mice 6 d after adoptive transfer of cells as in a; (results normalized as in Fig. 1b and presented relative to those of control T<sub>H</sub>0 cells). (f) Gene expression in T<sub>H</sub>9 cells differentiated *in vitro* in the presence of IL-1 $\beta$  6 d after *in vivo* transfer into tumor-bearing wild-type mice versus that in T<sub>H</sub>9 cells induced *in vitro* in the presence of IL-1 $\beta$ ;  $r^2 = 0.9457$ ; outer diagonal lines, 95% confidence intervals of linear regression curve (middle line). FPKM, fragments per kilobase of exon per million fragments mapped. (g) B16-F10 lung tumor foci in wild-type mice 13 d after injection of B16-F10 cancer cells with or without transfer of effector CD4<sup>+</sup> T cells (polarized as in a) with transgenic expression of a TRP-1-specific TCR. (h) Tumor growth (left) and survival (right) of wild-type mice given subcutaneous injection of B16-F10 cells and, 5 and 10 d later, given intravenous injection of  $2 \times 10^6$  effector T cells (polarized as in a) with transgenic expression of a TRP-1-specific TCR. (i) Incidence of primary tumor and cutaneous metastasis, monitored once a week in 4-week old MT-ret mice given intravenous injection of  $2 \times 10^6$  effector CD4<sup>+</sup> T cells (polarized as in a) with transgenic expression of a TRP-1-specific TCR, presented as frequency of mice without detectable uveal tumor (top) or without detectable cutaneous metastasis (bottom). Each symbol (a, b, g) represents an individual mouse. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  (Kruskal-Wallis test (a–c, e–h) or log-rank test (d, h)); <sup>†</sup> $P < 0.05$  (no transfer versus T<sub>H</sub>9 without IL-1 $\beta$ ) and <sup>‡</sup> $P < 0.01$  (no transfer versus T<sub>H</sub>9 with IL-1 $\beta$ ) (log-rank test). NS, not significant. Data are pooled from three independent experiments with five mice per group (a–d, h) or two to four mice per group (i) or from two independent experiments with three mice per group (g) or are from one experiment representative of at least two independent experiments with similar results, with four mice per group (e; mean and s.e.m. of three biological replicates).

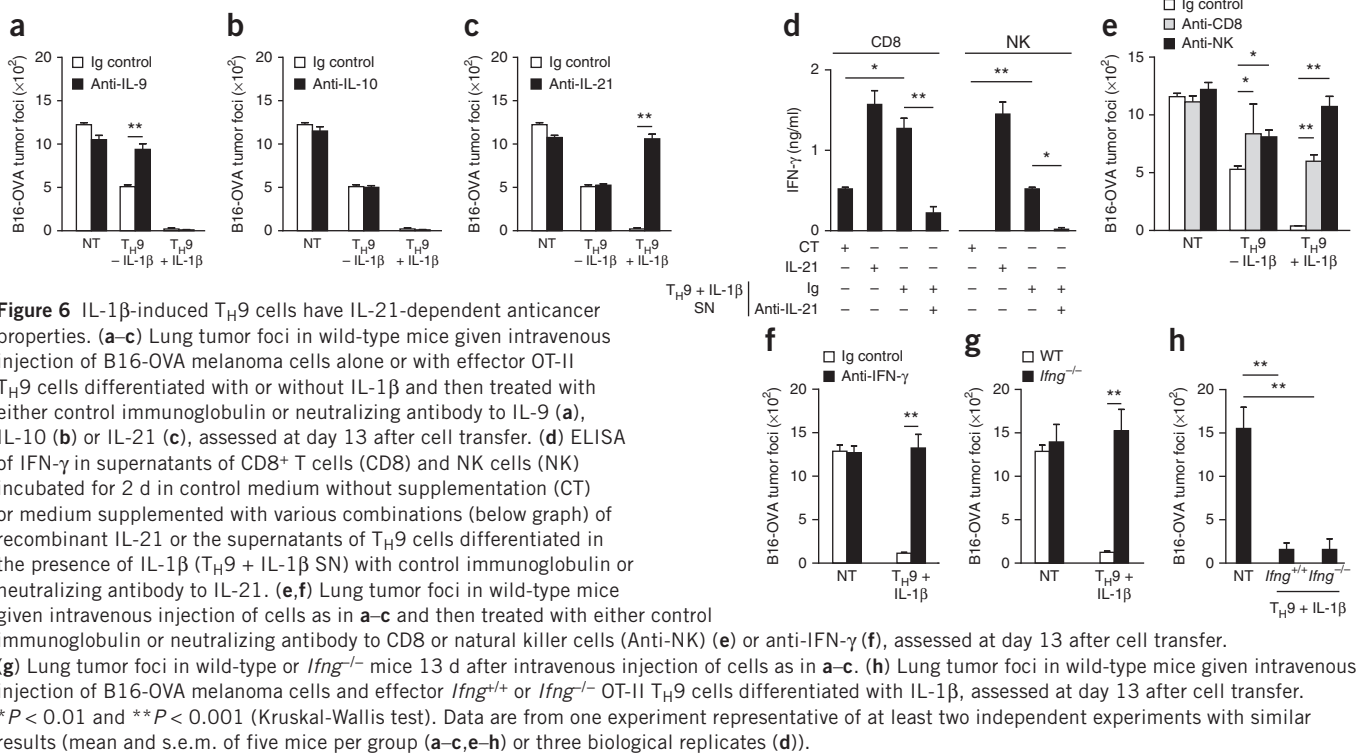
treatment with cyanidin 3-glucoside, which suppressed the induction of IRF1 expression in IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells (Supplementary Fig. 3), diminished the anticancer efficacy of these cells (Fig. 7a). We also crossed OT-II mice with IRF1-deficient (*Irf1*<sup>-/-</sup>) mice, obtained CD4<sup>+</sup> T cells from the *Irf1*<sup>+/+</sup> OT-II mice or *Irf1*<sup>-/-</sup> OT-II progeny and generated IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells from those CD4<sup>+</sup> T cells. As expected, IL-1 $\beta$  failed to enhance the secretion of IL-21 from *Irf1*<sup>-/-</sup> OT-II T<sub>H</sub>9 cells (Fig. 7b). We then transferred the differentiated effector cells into wild-type mice bearing B16-OVA tumors and found that IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells generated from *Irf1*<sup>-/-</sup> OT-II mice were ineffective at controlling tumor growth (Fig. 7c). To verify that IRF1 controlled the anticancer functions of T<sub>H</sub>9 cells, we retrovirally overexpressed IRF1 in naive OT-II CD4<sup>+</sup> T cells, differentiated them into T<sub>H</sub>9 cells without IL-1 $\beta$  and assessed their anticancer properties *in vivo*. Overexpression of IRF1 in OT-II T<sub>H</sub>9 cells induced without IL-1 $\beta$  strongly enhanced their secretion of IL-21 and their antitumor effects (Fig. 7d,e). Collectively, these data demonstrated that expression of IRF1 endowed T<sub>H</sub>9 cells with IL-21-dependent anticancer properties.

## DISCUSSION

In this study, we found that the proinflammatory factor IL-1 $\beta$  drove expression of the transcription factor IRF1, which transcriptionally

enhanced the ability of T<sub>H</sub>9 cells to produce IL-9 and IL-21 and endowed them with anticancer properties. *In vivo*, T<sub>H</sub>9 cell-derived IL-21, but not IL-9, drove the secretion of IFN- $\gamma$  from NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells that were required for the anticancer efficacy of T<sub>H</sub>9 cells *in vivo*. Finally, the anticancer effects of IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells were totally dependent on their expression of IRF1, which identifies IRF1 as a critical transcription factor that mediates the anticancer effect of T<sub>H</sub>9 cells.

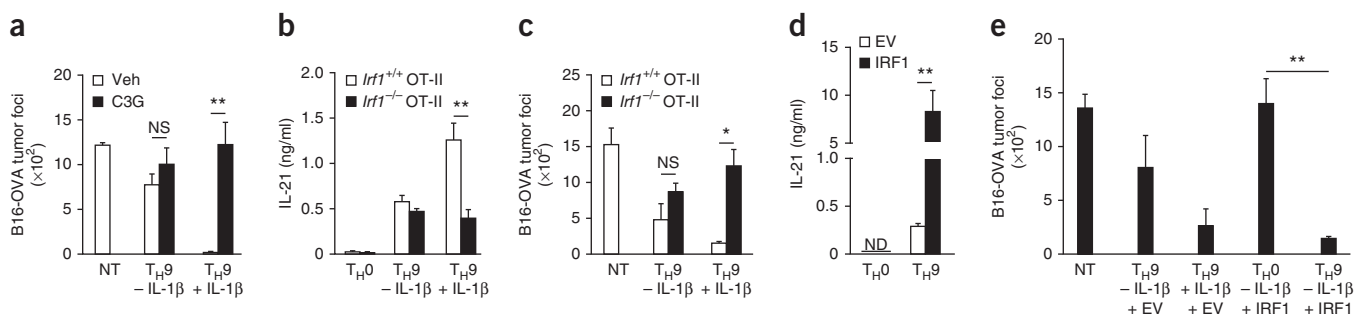
T<sub>H</sub>9 cells were initially characterized as CD4<sup>+</sup> T cells that lack expression of the transcription factor Foxp3 and have abundant production of IL-9 (refs. 5,6). In addition to relying on TGF- $\beta$ , T<sub>H</sub>9 cells rely on IL-4, the prototypic T<sub>H</sub>2 cytokine, for their development<sup>5,6,32</sup>. T<sub>H</sub>2 cells can be reprogrammed into T<sub>H</sub>9 cells by TGF- $\beta$ , which illustrates the close reciprocal relationships between T<sub>H</sub>2 cells and T<sub>H</sub>9 cells<sup>6</sup>. Such proximity between T<sub>H</sub>2 cells and T<sub>H</sub>9 cells is also emphasized by their dependence on the transcription factor IRF4, which critically affects the induction of both subsets<sup>8,10</sup>. IRF1 was originally identified as a virus-inducible nuclear factor that regulates the secretion of antiviral interferons<sup>33</sup>. Subsequent studies have emphasized the critical role of IRF1 in the regulation of adaptive immune responses<sup>34,35</sup>. IRF1 expression is mandatory for IL-12-driven T<sub>H</sub>1 differentiation and concomitant transcriptional repression of the *Ii4*



promoter<sup>17,18,36,37</sup>. The high IL-1 $\beta$ -driven expression of *Irf1* in T<sub>H</sub>9 cells was thus unexpected, since *Irf1* was initially identified as a T<sub>H</sub>1 cell-specific transcription factor<sup>17,18</sup>. While those initial observations supported the contention that *Irf1* expression would be relevant only in T<sub>H</sub>1 cells, our results suggest instead that IRF1 also transcriptionally controls the effector function of T<sub>H</sub>9 cells. The identification of IRF1 as a factor that dictates the secretion of IL-9 and IL-21 from T<sub>H</sub>9 cells not only illustrates the ability of IRF1 to dictate the effector functions of non-T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> T cells but also provides additional evidence that T<sub>H</sub>9 cells represent a CD4<sup>+</sup> T cell lineage distinct from the T<sub>H</sub>2 lineage.

The expression of IRF1 in developing T<sub>H</sub>9 cells induced with IL-1 $\beta$  suggested that they might be unstable *in vivo* and might ‘trans-differentiate’ into T<sub>H</sub>1 cells. In this context, findings obtained

with models of experimental autoimmune encephalitis have shown that under inflammatory conditions *in vivo*, T<sub>H</sub>9 cells, like T<sub>H</sub>1 cells, begin to secrete IFN- $\gamma$ <sup>38</sup>. Here we investigated whether IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells might, like T<sub>H</sub>17 cells<sup>39</sup>, transition into IFN- $\gamma$ -producing cells *in vivo*. However, we found that in a cancer setting, IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells retained their phenotype, and we ruled out the possibility of a contribution by T<sub>H</sub>9 cell-derived IFN- $\gamma$  to their anticancer effect. We found instead that T<sub>H</sub>9 cell-induced release of host-derived IFN- $\gamma$  was required for the anticancer effect of T<sub>H</sub>9 cells. These findings are in accordance with a report suggesting that T<sub>H</sub>9 cells are a stable cell population after transfer into tumor-bearing hosts<sup>13</sup>. While the reasons for the prevention of the transition of T<sub>H</sub>9 cells into IFN- $\gamma$ -producing cells in cancer remain elusive, these results collectively support the proposal that the anticancer activity of T<sub>H</sub>9



with models of experimental autoimmune encephalitis have shown that under inflammatory conditions *in vivo*, T<sub>H</sub>9 cells, like T<sub>H</sub>1 cells, begin to secrete IFN- $\gamma$ <sup>38</sup>. Here we investigated whether IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells might, like T<sub>H</sub>17 cells<sup>39</sup>, transition into IFN- $\gamma$ -producing cells *in vivo*. However, we found that in a cancer setting, IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells retained their phenotype, and we ruled out the possibility of a contribution by T<sub>H</sub>9 cell-derived IFN- $\gamma$  to their anticancer effect. We found instead that T<sub>H</sub>9 cell-induced release of host-derived IFN- $\gamma$  was required for the anticancer effect of T<sub>H</sub>9 cells. These findings are in accordance with a report suggesting that T<sub>H</sub>9 cells are a stable cell population after transfer into tumor-bearing hosts<sup>13</sup>. While the reasons for the prevention of the transition of T<sub>H</sub>9 cells into IFN- $\gamma$ -producing cells in cancer remain elusive, these results collectively support the proposal that the anticancer activity of T<sub>H</sub>9



cells is not due to their 'trans-differentiation' into T<sub>H</sub>1 cells. Our findings thus indicate that IL-1 $\beta$  and the related factor IRF1 are amplification and/or stabilization factors for highly active T<sub>H</sub>9 effector cells, which suggests that T<sub>H</sub>9 cells may have enhanced antitumor properties in the context of an IL-1 $\beta$ -rich tumor microenvironment. This is relevant because in the context of cancer, inflammation is frequently observed, and release of IL-1 $\beta$  from melanoma cells has been noted<sup>40</sup>.

IL-21 is a cytokine produced by activated CD4<sup>+</sup> T cells that stimulates IFN- $\gamma$  production and enhances the cytolytic activity of NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells in synergy with IL-2 and IL-15. IL-21 potently augments the IL-15-induced proliferation of mouse CD8<sup>+</sup> T cells and promotes the clonal expansion of antigen-stimulated human CD8<sup>+</sup> T cells<sup>41</sup>. In line with those reports, we found that the secretion of IL-21 from IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells featured NK cell- and CD8<sup>+</sup> T cell-dependent anticancer effects. In humans, the safety and the efficacy of IL-21 were investigated in a multicenter phase II study of patients with metastatic melanoma. The overall response rate to IL-21 was 22.5% for first-line metastatic melanoma, which suggests that this is an active agent for the prevention of cancer progression<sup>42</sup>. In this context, our observations that beyond their IL-9 production, IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells also secreted copious amounts of IL-21 suggest that these cells might represent a likely candidate for clinical evaluation. The advantage of cellular therapy over the administration of recombinant cytokines is that T cells could home to the tumor bed and secrete larger amounts of cytokines at the tumor site.

While treating cancer through the adoptive transfer of T cells has long relied on CD8<sup>+</sup> T cells<sup>43</sup>, preclinical data have emphasized the potential of CD4<sup>+</sup> T cells to mediate tumor rejection<sup>44</sup>. Proof of the principle that the transfer of CD4<sup>+</sup> T cells specific for the tumor antigen NY-ESO-1 can be used to treat human metastatic melanoma has also been established<sup>45</sup>. This approach has been proven safe and does not require any previous conditioning or treatment with cytokines, which indicates that the adoptive transfer of CD4<sup>+</sup> T cells can be implemented in a clinical situation. The transfer of NY-ESO-1-specific CD4<sup>+</sup> T cells drives endogenous responses to melanoma antigens other than NY-ESO-1, which suggests that the efficacy of CD4<sup>+</sup> T cell transfer relies on responses by the patient's immune system to other antigens displayed by the tumor<sup>45</sup>. In this context, while T<sub>H</sub>9 cells induced without IL-1 $\beta$  fail to activate effector T cells<sup>12</sup>, our work indicating that IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells activated effector CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells thus provides an impetus to investigate the anticancer efficacy of these cells in patients with cancer.

In summary, we have shown that IRF1 acts as a key transcription factor in T<sub>H</sub>9 cell biology. Expression of IRF1 in T<sub>H</sub>9 cells reinforced their secretion of effector cytokines and dictated their anticancer functions. Given the proinflammatory functions of T<sub>H</sub>9 cells *in vivo*, the identification of IRF1 as a key transcription factor that dictates the effector functions of T<sub>H</sub>9 cells is relevant for cancer treatment but could also prove beneficial in the design of targeted therapies aimed at alleviating the course of allergic and autoimmune diseases.

## METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

**Accession codes.** GEO: RNAseq data, [GSE54697](#).

*Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.*

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank J.C. Renaud (Université catholique de Louvain) and V. Kuchroo (Brigham and Women's Hospital) for *Il9r1*<sup>-/-</sup> mice and *Il21r1*<sup>-/-</sup> mice; B. Ryffel (Université d'Orléans) for *Ticam1*<sup>-/-</sup>, *Myd88*<sup>-/-</sup>, *Il1r1*<sup>-/-</sup> and *Ifng*<sup>-/-</sup> mice; A. Prévost-Blondel (Cochin Institute) for MT-ret mice; J.D. Rosenblatt (University of Miami Miller School of Medicine) for B16-OVA cells; and R. Vile (Mayo Clinic) for LLC-OVA cells. Supported by the French National Research Agency ("Investissements d'Avenir" program; ANR-11-LABX-0021), the Ligue nationale contre le cancer (F.G. and F.V.), the Fondation de France (L.A.), the Institut National du Cancer (F.G.), the Association pour la recherche sur le cancer (L.A., F.G., G.M. and A.P.-B.), the Conseil Régional de Bourgogne/INSERM (H.B.), the Centre National de la Recherche Scientifique, Fonds Européen de Développement Économique et Régional, Le Studium, Orléans and Fondation pour la Recherche Médicale (F.G. and B.R.), the French National Research Agency (ANR-13-JSV3-0001 to L.A.), the Fondation pour l'aide à la Recherche sur la Sclérose en Plaques (L.A. and M.D.), the Ligue Régionale contre le cancer Comité Grand-Est (L.A.) and the European Commission (PCIG10-GA-2011-303719 to L.A.).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.V. and H.B. did *in vitro* and *in vivo* experiments; G.M. and A.P.-B. did *in vivo* experiments; R.B., M.B., M.D., F.C., C.R. and V.D. did *in vitro* experiments; B.R., M.K. and A.P.-B. provided materials and suggestions for the study; and F.G. and L.A. supervised the study and wrote the manuscript.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348–2357 (1986).
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
- Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M. & Hafler, D.A. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 490–500 (2010).
- Dardalhon, V. *et al.* IL-4 inhibits TGF- $\beta$ -induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF- $\beta$ , generates IL-9<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> effector T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1347–1355 (2008).
- Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* **9**, 1341–1346 (2008).
- Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E. & Kuchroo, V.K. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* **183**, 7169–7177 (2009).
- Staudt, V. *et al.* Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* **33**, 192–202 (2010).
- Chang, H.C. *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* **11**, 527–534 (2010).
- Rengarajan, J. *et al.* Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J. Exp. Med.* **195**, 1003–1012 (2002).
- Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C. & Maki, R.A. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* **61**, 113–124 (1990).
- Purwar, R. *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat. Med.* **18**, 1248–1253 (2012).
- Lu, Y. *et al.* Th9 cells promote antitumor immune responses *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **122**, 4160–4171 (2012).
- Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15**, 1170–1178 (2009).
- Chung, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* **30**, 576–587 (2009).
- Horka, H. *et al.* The tick salivary protein sialostatin L inhibits the Th9-derived production of the asthma-promoting cytokine IL-9 and is effective in the prevention of experimental asthma. *J. Immunol.* **188**, 2669–2676 (2012).
- Taki, S. *et al.* Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1. *Immunity* **6**, 673–679 (1997).
- Lohoff, M. *et al.* Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response *in vivo*. *Immunity* **6**, 681–689 (1997).
- Nizamutdinova, I.T. *et al.* Anthocyanins from black soybean seed coats preferentially inhibit TNF- $\alpha$ -mediated induction of VCAM-1 over ICAM-1 through the regulation of GATAs and IRF-1. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 7324–7330 (2009).

20. Kara, E.E. *et al.* Distinct chemokine receptor axes regulate Th9 cell trafficking to allergic and autoimmune inflammatory sites. *J. Immunol.* **191**, 1110–1117 (2013).
21. Adachi, O. *et al.* Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9**, 143–150 (1998).
22. Burns, K. *et al.* MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 12203–12209 (1998).
23. Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V.R. & Darnell, J.E. Jr. Activation of transcription by IFN- $\gamma$ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* **258**, 1808–1812 (1992).
24. Varinou, L. *et al.* Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity* **19**, 793–802 (2003).
25. Darnell, J.E. Jr., Kerr, I.M. & Stark, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415–1421 (1994).
26. Liu, A. *et al.* TRAF6 protein couples Toll-like receptor 4 signaling to Src family kinase activation and opening of paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *J. Biol. Chem.* **287**, 16132–16145 (2012).
27. Kato, M. *et al.* Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* **17**, 1885–1888 (1998).
28. Lengagne, R. *et al.* Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: role of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Res.* **64**, 1496–1501 (2004).
29. Eyles, J. *et al.* Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J. Clin. Invest.* **120**, 2030–2039 (2010).
30. Frederiksen, K.S. *et al.* IL-21 induces *in vivo* immune activation of NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1439–1449 (2008).
31. Spolski, R. & Leonard, W.J. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 57–79 (2008).
32. Schmitt, E. *et al.* IL-9 production of naive CD4<sup>+</sup> T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF- $\beta$  and IL-4, and is inhibited by IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* **153**, 3989–3996 (1994).
33. Miyamoto, M. *et al.* Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- $\beta$  gene regulatory elements. *Cell* **54**, 903–913 (1988).
34. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 623–655 (2001).
35. Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 644–658 (2006).
36. Elser, B. *et al.* IFN- $\gamma$  represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* **17**, 703–712 (2002).
37. Kano, S. *et al.* The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon- $\gamma$ -interleukin 12 signaling axis and T<sub>H</sub>1 versus T<sub>H</sub>17 differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 34–41 (2008).
38. Jäger, A. & Kuchroo, V.K. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand. J. Immunol.* **72**, 173–184 (2010).
39. Muranski, P. *et al.* Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity* **35**, 972–985 (2011).
40. Okamoto, M. *et al.* Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* **285**, 6477–6488 (2010).
41. Zeng, R. *et al.* Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8<sup>+</sup> T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* **201**, 139–148 (2005).
42. Petrella, T.M. *et al.* Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a Phase II study. *J. Clin. Oncol.* **30**, 3396–3401 (2012).
43. Dudley, M.E. *et al.* Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* **298**, 850–854 (2002).
44. Muranski, P. & Restifo, N.P. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4<sup>+</sup> T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 200–208 (2009).
45. Hunder, N.N. *et al.* Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4<sup>+</sup> T cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2698–2703 (2008).

## ONLINE METHODS

**Mouse strains.** All animals were bred and maintained according to both guidelines of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations and Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, France). Animals were used between 6 and 22 weeks of age. Female C57BL/6 mice were from Centre d'élevage Janvier (Le Genest St Isle, France). OT-II mice were from Charles River Laboratories. Mice with transgenic expression of a TCR on CD4<sup>+</sup> T cells that recognizes the antigen TRP-1 were from JAX. *Il9r<sup>-/-</sup>* mice<sup>46</sup> and *Il21r<sup>-/-</sup>* mice were provided by J.C. Renaud and V. Kuchroo. *Irf1*-deficient mice were from Jax. *Ticam1<sup>-/-</sup>*, *Myd88<sup>-/-</sup>*, *Il1r1<sup>-/-</sup>* and *Ifng<sup>-/-</sup>* mice were provided by B. Ryffel. Ly5.1<sup>+</sup> mice were provided by the CDTA (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal) and were distributed by EMMA (a service funded by the EC FP7 Capacities Specific Programme). MT-ret mice with heterozygous expression of the human RET oncogene were provided by A. Prévost-Blondel. All transgenic mice used were on a C57BL/6 background and were age-matched with wild-type controls for experiments. For experiments with MT-ret mice, only males were used.

**Tumor-growth experiments.** B16-F10, B16-OVA melanoma and LLC-OVA were cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 medium with Glutamax-1 (Lonza) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (Lonza), 1% penicillin, streptomycin, amphotericin B (Gibco), 4 mM HEPES (Gibco) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco). B16-OVA and LLC-OVA cells were provided by J.D. Rosenblatt and R. Vile, respectively. B16-F10 cells were from American Type Culture Collection. All cells were routinely tested for mycoplasma contamination with a Mycoalert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) and were found to be negative. 2 × 10<sup>5</sup> B16-OVA cells were injected subcutaneously into mice. Alternatively, 2 × 10<sup>5</sup> B16-OVA cells or 4 × 10<sup>5</sup> LLC-OVA cells were injected intravenously into mice. Lung tumor foci were counted after 13 d by reasurers 'blinded' to sample identity. In some experiments, cyclophosphamide and IL-1R antagonist (Anakira) were administered intraperitoneally at a dose of 100 mg and 1.5 mg, respectively, per kg body weight. The IL-1R antagonist was given on days 0, 1, 3 and 6 following tumor inoculation. Tumor-draining lymph node cells from B16-F10 tumor-bearing mice were labeled with the following antibodies: anti-CD4 (GK1.5; Miltenyi Biotec), anti-CCR3 (REA122; Miltenyi Biotec), anti-CCR6 (REA277; Miltenyi Biotec), anti-CXCR3 (CXCR3-177; Miltenyi Biotec) and anti-CCR4 (2G12; BioLegend) and cells were sorted by flow cytometry. MT-ret mice were monitored once a week for primary tumor and cutaneous metastasis. *In vivo* neutralization of IL-9, IL-10, IL-21 or IFN-γ was achieved by intraperitoneal injection of 200 μg anti-IL-9 (MM9C1; BioXcell), anti-IL-10 (JES5-2A5; BioXcell), anti-IL-21 (FFA21, eBioscience) or anti-IFN-γ (XMG1.2; BioXcell), respectively, on days -1, 0, 1, 3 (relative to injection of tumor cells) and every 3 d after tumor implantation. For depletion of CD8<sup>+</sup> T cells or NK cells, anti-CD8 (2.43; BioXcell) or anti-NK1.1 (PK136; BioXcell), respectively, was used.

**In vitro differentiation of T cells.** Naive CD4<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup>) were obtained from spleens and lymph nodes of mice. Isolated naive T cells were routinely 98% pure. CD4<sup>+</sup> T cells were purified from spleen and lymph nodes with anti-CD4 microbeads (Miltenyi Biotec), then were further sorted as naive CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> T cells by flow cytometry with fluorescein isothiocyanate-anti-CD4 (RM4-4; BD Biosciences) and Alexa Fluor 700-anti-CD62L (MEL-14; BD Biosciences). Isolated naive CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 (2 μg/ml; 145-2C11; BioXcell) and anti-CD28 (2 μg/ml; PV-1; BioXcell) and were polarized into effector CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets without cytokines (T<sub>H</sub>0 cells) or with mouse TGF-β (2 ng/ml) and IL-4 (20 ng/ml) for differentiation into T<sub>H</sub>9 cells in the presence or absence of IL-1β (10 ng/ml; Miltenyi Biotec). In some experiments, cyanidin-3-glucoside was added at a final concentration of 300 μM (Extrasynthèse). Cells were usually harvested on day 3 (unless specified otherwise) for detection of cytokines by ELISA and real-time quantitative PCR analysis.

**RNA sequencing.** Total RNA was extracted, with TRIzol reagent, from conventionally differentiated T<sub>H</sub>9 cells and T<sub>H</sub>9 cells differentiated with IL-1β. rRNA was removed with a Ribominus kit (Invitrogen, Life Technologies) and mRNA polyA was purified with a NEBNext Poly(A) mRNA magnetic isolation module (New England Biolabs). 100 ng of rRNA-depleted RNA was used for the preparation

of a library with a NEXtflex RNAseq kit according to the manufacturer's instructions (Bioos Scientific). RNA was sequenced on a MiSeq device (Illumina). Data were analyzed via the Galaxy web-based platform interface<sup>47</sup>. Files in the FASTQ format were mapped with the BWA software package (for mapping sequences of low divergence) for Illumina sequence 'reads'<sup>48</sup> and then were converted into files in the BAM format (binary version of SAM text file containing sequence-alignment data). The first comparison between the two cell subtypes used these BAM files and the Golden Helix Genome Browser. The TopHat splice-junction mapper for Illumina RNA-sequencing 'reads'<sup>49</sup> was used for the second analysis. The files generated were processed with Cufflinks software<sup>50</sup> to obtain annotated expressed genes in each studied subtype. Then, differences between the two subtypes in their gene expression were analyzed with the Cuffdiff program of Cufflinks software<sup>50</sup>.

**Retroviral transduction.** For infection of cells with retrovirus, *Irf1* was cloned into pMYs-IRES-GFP retroviral vector (Cell Biolabs). cDNA was amplified by PCR with the oligonucleotide primers 5'-ATATATGCGGCCGCGCCACCA-3' and 5'-ATATATGCGGCCGCTATGGTGCAC-3' to introduce NotI restriction enzyme sites for subcloning. DNA fragments were ligated with T4 DNA ligase (Promega). The orientation of the insert was determined by PCR and digestion with restriction enzymes.

According to manufacturer's instructions, Platinum-E retroviral packaging cells (Cell Biolabs) were plated 24 h before transfection of retroviral particles. Retroviral particles were generated by transfection of the Platinum-E cells with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 2 d, fresh viral supernatant was harvested and then was mixed with proliferative CD4<sup>+</sup> naive T cells and 10 μg/ml protamine sulfate (APP Pharmaceuticals) in a 24-well plate, followed by centrifugation for 90 min at 2,000g at 32 °C. The transduced CD4<sup>+</sup> naive T cells were harvested after 2 d and cells were sorted according to GFP expression. GFP<sup>+</sup> cells were differentiated as described above. Three days later, the cells were harvested for adoptive transfer and cell supernatants were analyzed by ELISA.

**siRNA transfection.** For transfection experiments, naive CD4<sup>+</sup> T cells were transfected with Silencer Select Predesigned siRNA specific for mouse *Irf1* (s68377; Ambion, Life Technologies) or mouse *Stat1* (s74444; Ambion) or mouse *Fyn* (ID: s66295) or *Silencer* Negative Control No. 1 (Ambion) with transfection reagent TransIT-TKO according to the manufacturer's instructions (Mirus Bio). 24 h after transfection, CD4<sup>+</sup> T cells were restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 (identified above), then were differentiated into T<sub>H</sub>0 or T<sub>H</sub>9 cells in the presence of IL-1β as described above and were cultured for an additional 24 or 72 h before analysis.

**Measurement of cytokines.** After 72 h of polarization, cell culture supernatants were assayed by ELISA for mouse IL-9 (BioLegend), IL-10 (BD Biosciences) or IL-21 (R&D systems) according to manufacturer's protocol.

For staining of intracellular cytokines, cells were cultured for 3 d, restimulated for 3 additional days and then stimulated for 4 h at 37 °C in culture medium containing PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 50 ng/ml; Sigma-Aldrich), ionomycin (1 μg/ml; Sigma-Aldrich), monensin (GolgiStop; 1 μl/ml; BD Biosciences) and brefeldin A (2 μl/ml; eBioscience). After staining of surface markers (with antibodies identified above) and with 7-amino-actinomycin D, cells were fixed and permeabilized with a Cytotfix/Cytoperm kit according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences), then intracellular products were stained (with antibodies identified below). Monoclonal antibodies used for flow cytometry were as follows: fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4 (GK1.5; BD Biosciences) and allophycocyanin-conjugated anti-IL-9 (RM9A4; BioLegend), IL-21R-Fc chimera (991-R2-100; R&D Systems) and Alexa Fluor 647-conjugated affinity-purified goat antibody (F(ab)<sub>2</sub> fragment) specific for the Fcγ fragment of human immunoglobulin G (109-606-008; Jackson ImmunoResearch Laboratories). All events were acquired by a BD LSRII cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD Biosciences) and data were analyzed with FlowJo software (TreeStar).

**Immunoblot analysis.** Purified naive T cells were differentiated for 24 h into T<sub>H</sub>0 or T<sub>H</sub>9 cells with or without IL-1β, then were collected and pelleted by centrifugation for 5 min at 2,000g. Cells were lysed for 20 min at 4 °C

in boiling buffer (1% sodium dodecyl sulfate, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM Tris, pH 7.4, and 10 mM PMSF) containing protease inhibitor 'cocktail'. Cell lysates were subjected to sonication for 10 s at 10% of the maximum sonication intensity, and protein concentrations were assessed using a Bio-Rad DC protein assay kit. Proteins were then denatured, separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell). After blockade of nonspecific binding with 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST), membranes were incubated overnight with primary antibody diluted in TBST containing 1% BSA, then were washed and then incubated for 1 h with secondary antibody diluted in a solution of 1% BSA in TBST. After additional washes, membranes were incubated with Luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology) and were exposed to X-ray films. The following mouse monoclonal antibodies were used: anti-IRF1 (TK1; eBiosciences), anti-IRF4 (M-17; Santa Cruz), anti-PU.1 (2G1; Novus Biologicals), anti-STAT1 (42H3; Cell Signaling) and anti- $\beta$ -actin (poly6221; BioLegend). The following rabbit polyclonal antibodies were used: antibody to STAT1 phosphorylated at Ser727 (D3B7; Cell Signaling) and antibody to STAT1 phosphorylated at Tyr701 (D4A7; Cell Signaling). Secondary antibodies horseradish peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-mouse (115-035-174; Jackson ImmunoResearch) and polyclonal rabbit antibody to goat immunoglobulin (305-035-003; Jackson ImmunoResearch) were also used.

**ChIP assay.** Cells were differentiated for 24 h into T<sub>H0</sub> or T<sub>H9</sub> cells with or without IL-1 $\beta$ . Chromatin was immunoprecipitated with a ChIP-IT Express Enzymatic kit according to the manufacturer's instructions (Active Motif). Cells were fixed for 10 min in a solution containing 37% formaldehyde and reactions were quenched with 0.125 M glycine. Chromatin was isolated and sheared to an average length of 300–500 base pairs. The DNA-containing chromatin (25  $\mu$ g DNA) was immunoprecipitated with anti-IRF1 (H-205; Santa Cruz Biotechnology). After elution of chromatin, crosslinks were reversed with Reverse Cross-linking Buffer, followed by real-time quantitative PCR. Data were normalized to the cycling-threshold (Ct) values for the gene encoding  $\beta$ -actin and are presented as enrichment relative to the results obtained by immunoprecipitation with immunoglobulin. Primers designed for the ChIP assay were as follows: *Actb*, 5'-ACTCTTTGCAGCCACATTC-3' and 3'-AGCGTCTGGTTCCCAATACT-5'; putative IRF1-binding sites on the *Il9* promoter, 5'-GCAGGCCAGTTACTCTGGAGTATA-3' and 5'-CCACCCAGGCACTTTATGTAA-3' (positions -965 to -956), 5'-CTC ACTAATGTGGAGGGGAAA-3' and 5'-GGCTGTCTTATGCCAGG AAA-3' (positions -239 to -230) and 5'-TTTCTGGCATAAGACAGCC-3' and 5'-GACTCTCCCCAGTCCCCTAA-3' (positions -61 to -52); putative IRF1-binding sites on the *Il21* promoter, 5'-GGTGGGTGAGGAAGCACC-3' and 5'-GGATCAAGAGCAGTGGTTTCC-3' (positions -2972 to -2963), 5'-ATCTGACGGTGCCTCTGTG-3' and 5'-GGTCTGGTTGTGACTTC AACCTG-3' (positions -2161 to -2152) and 5'-CACGGATTTACA CTACGGTCC-3' and 5'-CCCGTTTGCTTGTGTTTGTCC-3' (positions -193 to -184); and putative STAT1-binding site on the *Irf1* promoter, 5'-GG CCGTGGCCGAGTC-3' and 5'-GGAAGTACAAGGCAGCTGTGCT-3'.

**Luciferase transactivation assay.** The *Il9*-luc and *Il21*-luc luciferase constructs were obtained by insertion of fragments of the promoters of mouse *Il9* and

*Il21*, respectively, in the multicloning site of the pGL3 basic vector (Promega). Fragments were amplified by high-fidelity PCR with specific primers and genomic DNA from C57BL/6 mice as a template.

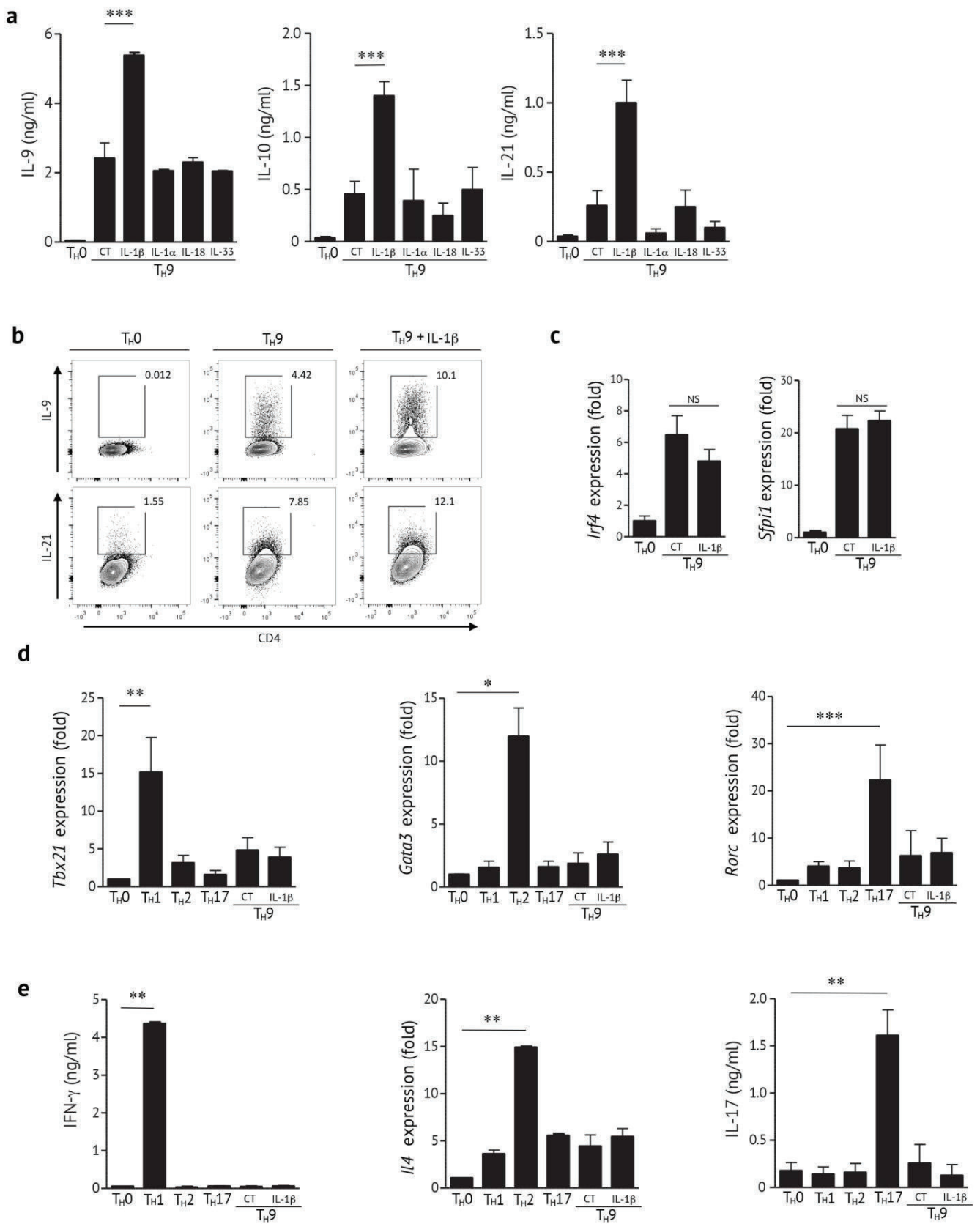
Mouse NIH3T3 cells (cultured at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in DMEM containing 4.5 g/l glutamine and FBS) were transiently transfected for 48 h with reporter plasmids and plasmids pCMV-SPORT6-IRF1, pCR4-TOPO-IRF4 and pCMV-SPORT6-PU.1 (Thermo Scientific) through the use of Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Luciferase was measured with the Dual Glo Luciferase Assay System according to the manufacturer's instructions (Promega). Dual Glo Luciferase Reagent was added to the cells. After 10 min of incubation, firefly luciferase activity was measured with a Wallac 1440 Victor2 luminometer (PerkinElmer). Reactions were stopped by treatment for 10 min with Dual-Glo Stop and Glo Reagent and renilla luciferase activity was then measured.

**Real-time quantitative PCR.** Total RNA from T cells was extracted with TriReagent (Ambion), then was reverse-transcribed with M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and was analyzed by real-time quantitative PCR by the SYBR Green method with the 7500 Fast Real Time PCR system, according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Expression was normalized to the expression of mouse *Actb*. Primers designed to assess gene expression were as follows: *Actb*, 5'-AT GGAGGGGAATACAGCCC-3' and 5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3'; *Tbx21*, 5'-ATCCTGTAATGGCTTGTGGG-3' and 5'-TCAACCAGCAC CAGACAGAG-3'; *Gata3*, 5'-AGGATGTCCCTGCTCTCCTT-3' and 5'-GCCTGCGGACTCTACCATAA-3'; *Foxp3*, 5'-CTCGTCTGAAGGCAG AGTCA-3' and 5'-TGCCAGAGAGGTATTGAGGG-3'; *Rorc*, 5'-GGT GATAACCCCGTAGTGGA-3' and 5'-CTGCAAAGAAGACCCACACC-3'; *Il9*, 5'-AACAGTCCCTCCCTGTAGCA-3' and 5'-AAGGATGATCCACCG TCAAA-3'; *Il21*, 5'-AAAACAGGCAAAAGCTGCAT-3' and 5'-TGAC ATTGTTGAACAGCTGAAA-3'; *Irf1*, 5'-AGGCATCCTTGTGATGTCC-3' and 5'-AATTCCAACCAATCCCAGG-3'; and *Il17*, 5'-TGAGCTTCCCA GATCACAGA-3' and 5'-TCCAGAAGGCCCTCAGACTA-3'.

**Statistical analysis.** Prism software (GraphPad) was used for statistical analyses. For two-group comparisons, the Mann-Whitney rank-sum test or the Wilcoxon signed-rank test was used. For multiple group comparison, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test was used. Comparison between incidence curves was made with the log-rank test. All *P* values are two tailed.

46. Steenwinckel, V. *et al.* IL-13 mediates *in vivo* IL-9 activities on lung epithelial cells but not on hematopoietic cells. *J. Immunol.* **178**, 3244–3251 (2007).
47. Taylor, J., Schenck, I., Blankenberg, D. & Nekrutenko, A. in *Current Protocols in Bioinformatics* (ed. Minor, W.) Ch. 10, Unit 10 15 (Wiley Online Library, 2007).
48. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
49. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105–1111 (2009).
50. Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **28**, 511–515 (2010).



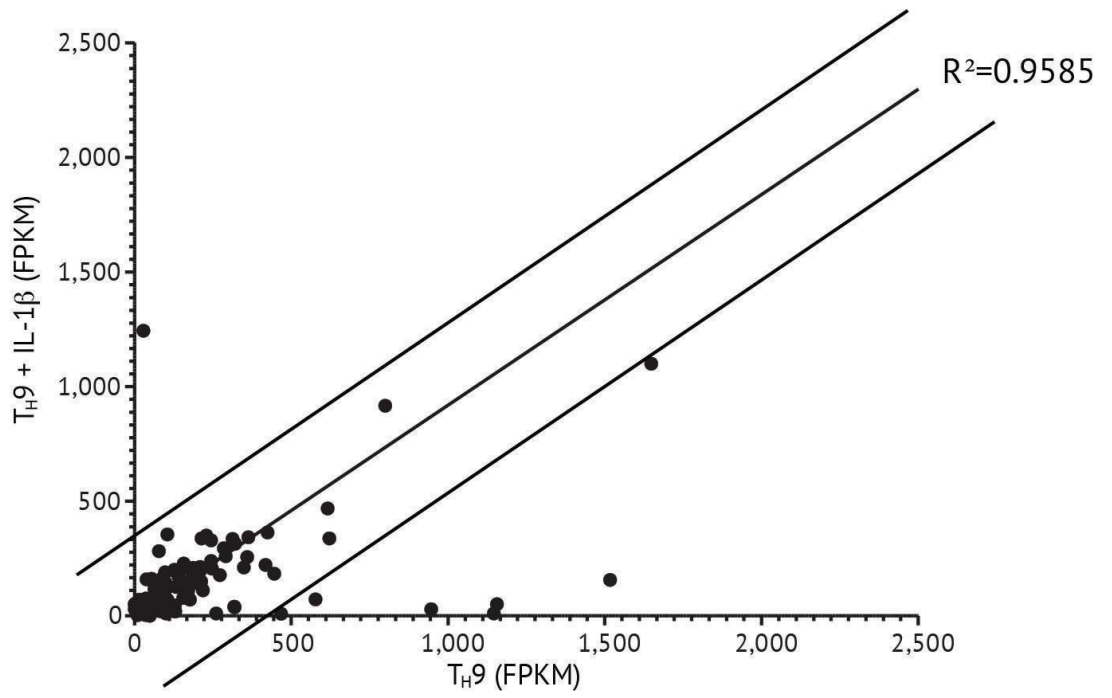


## Supplementary Figure 1

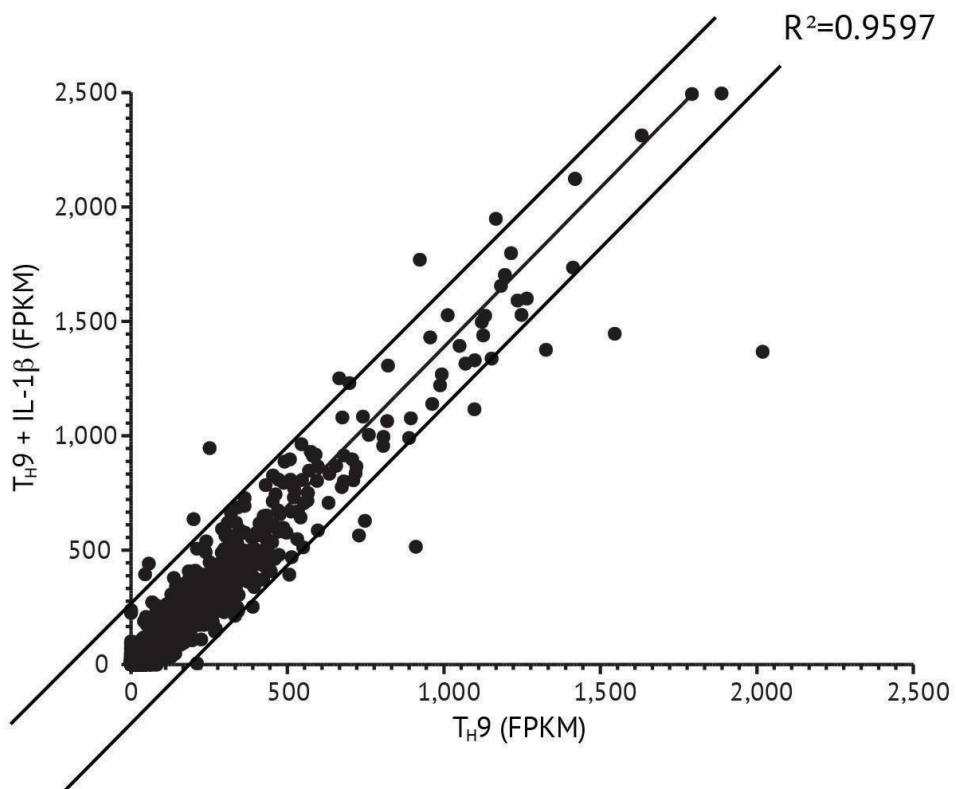
IL-1 $\beta$  enhances but does not skew T<sub>H</sub>9 cell polarization.

**a)** Cell-sorted naive CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> CD44<sup>lo</sup> T cells were isolated from mice and differentiated in the absence of any differentiating cytokines (T<sub>H</sub>0 cells) or with TGF- $\beta$  and IL-4 (T<sub>H</sub>9 cells) without (CT: control) or with IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 or IL-33 in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours and secretion of IL-9, IL-10 and IL-21 was assessed. **b)** Naive CD4 T cells were differentiated as in **(a)** into T<sub>H</sub>9 cells with or without IL-1 $\beta$  and IL-9 and IL-21 secretion was assessed by intracellular cytokine staining. **c)** Naive CD4 T cells were differentiated into T<sub>H</sub>0 or T<sub>H</sub>9 cells with or without IL-1 $\beta$  and *Irf4* and *Sfp1* expression was assessed by quantitative RT-PCR after 6 hours. **d)** Naive CD4 T cells were differentiated into T<sub>H</sub>0, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 or T<sub>H</sub>9 cells with or without IL-1 $\beta$  and *Tbx21*, *Gata3* and *Rorc* expression was assessed by quantitative RT-PCR after 24 hours. **e)** Same as in **(d)** and *Il4* expression level as well as IFN- $\gamma$  and IL-17 secretion were respectively determined using quantitative RT-PCR and ELISA. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 (Kruskal-Wallis test in **a**, **c-e**). Data are from one experiment representative of at least two independent experiments with similar results (mean and s.e.m. of three triplicates in **a**, **c-e**).

**a**



**b**

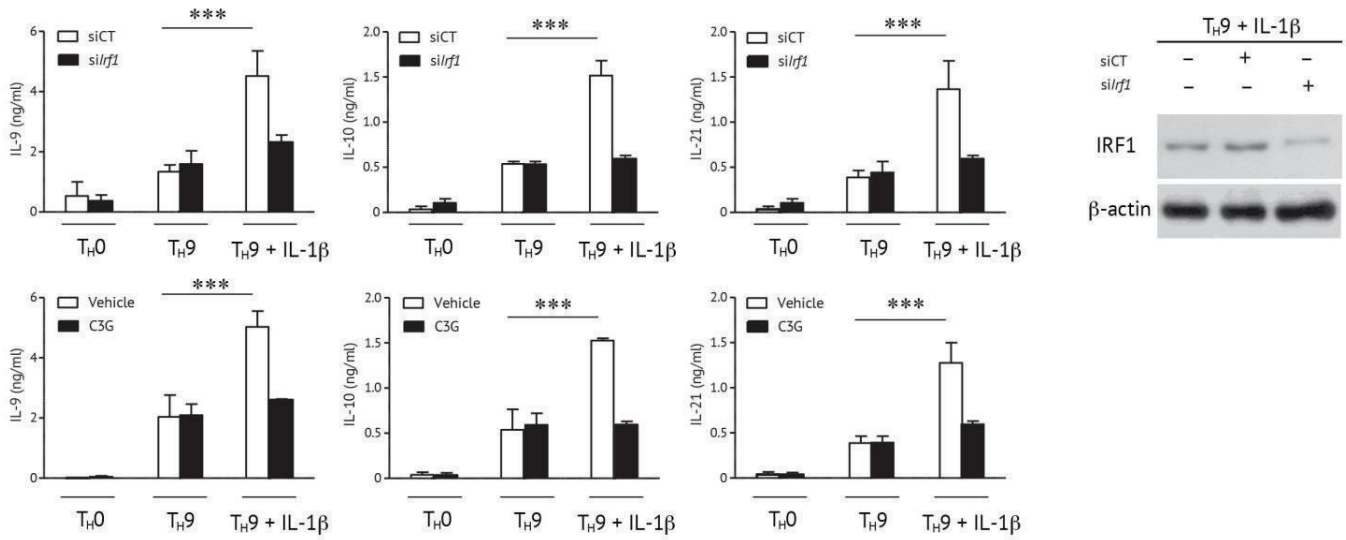


## Supplementary Figure 2

IL-1 $\beta$  does not globally affect T<sub>H</sub>9 cell differentiation.

Scatter plot providing an evaluation of the correlation of gene expression of T<sub>H</sub>9 cells in the presence or not of IL-1 $\beta$ . RNA sequencing analysis of naive CD4<sup>+</sup> T cells differentiated into T<sub>H</sub>9 cells in the presence or not of IL-1 $\beta$  was performed after 1 hour (panel **a**) or 3 days (panel **b**). The 95% confidence intervals for each linear regression curve are represented. FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped). Data are from one experiment representative of at least three independent experiments with similar results.

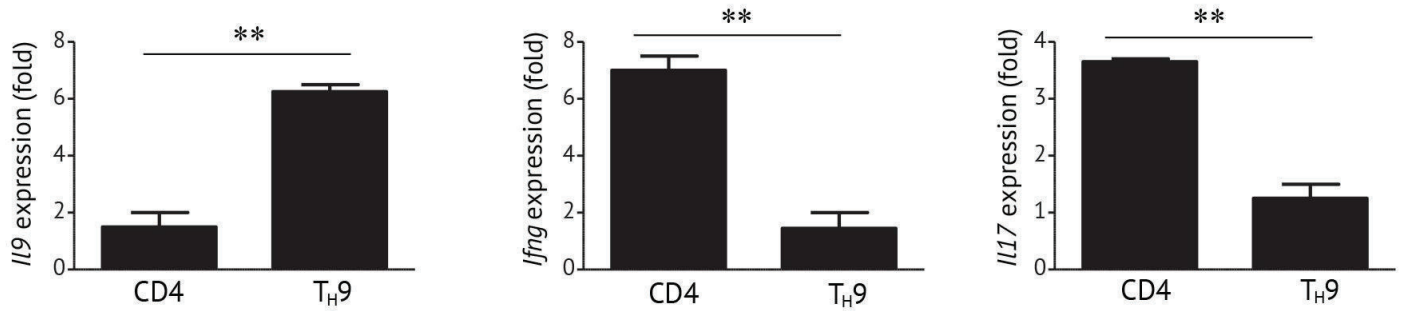




### Supplementary Figure 3

Downregulation of *Irf1* prevents the IL-1β-driven enhancement of T<sub>H</sub>9 cell cytokine secretion.

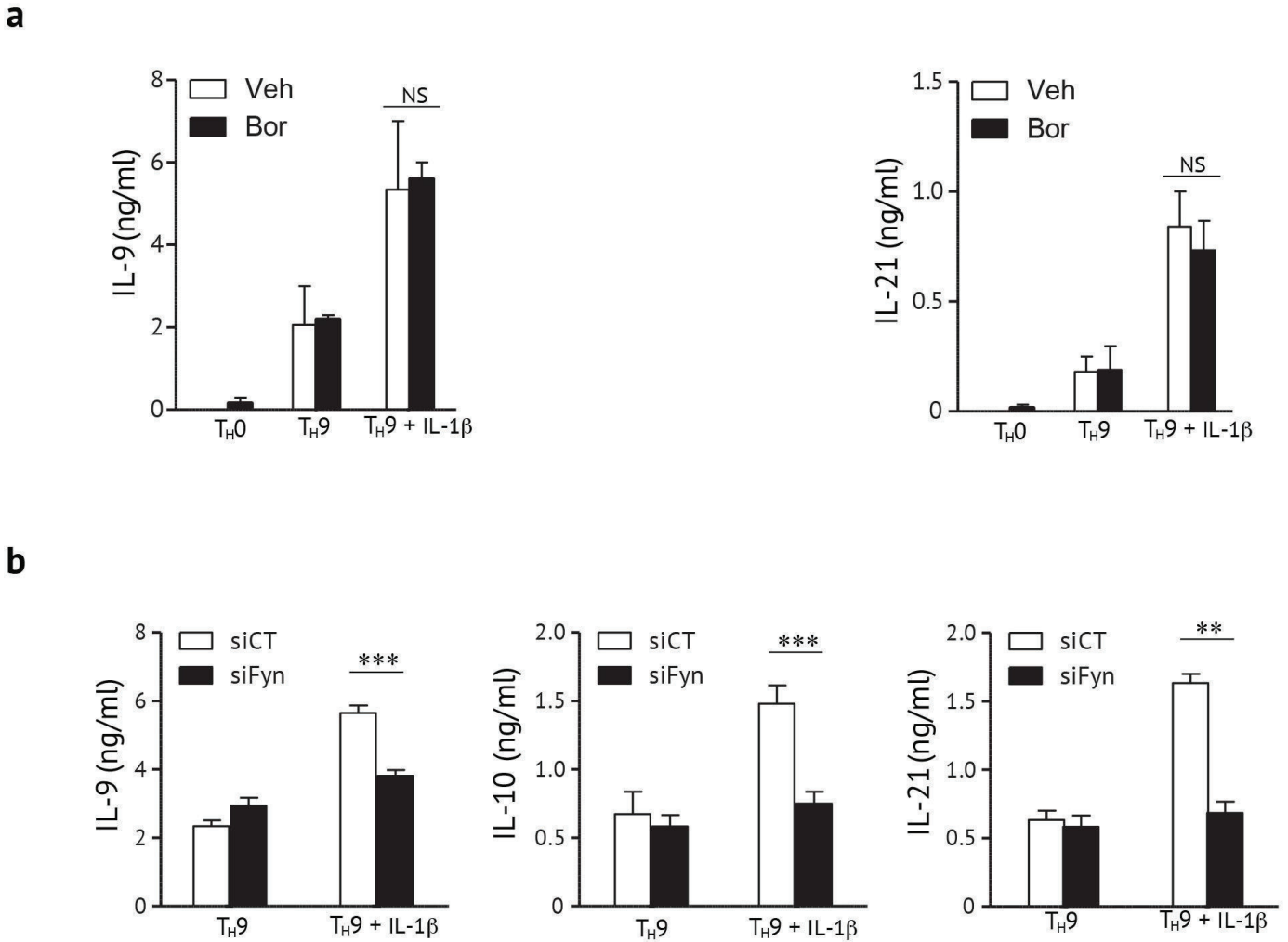
IL-9, IL-10 and IL-21 secretion levels were determined using ELISA after a three-day culture of wild-type naive CD4 T cells transduced with control or *Irf1* siRNA and polarized into effector cells (upper panel) or polarized into effector cells in the presence of Cyanidine-3-glucoside (C3G) (lower panel). \*\*\*P < 0.001 (Kruskal-Wallis test). Data are from one experiment representative of at least three independent experiments with similar results.



#### Supplementary Figure 4

T<sub>H</sub>9 cells can be identified *in vivo* by chemokine receptor expression.

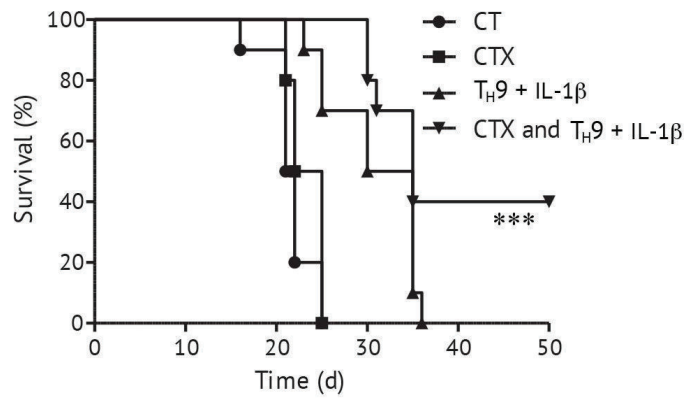
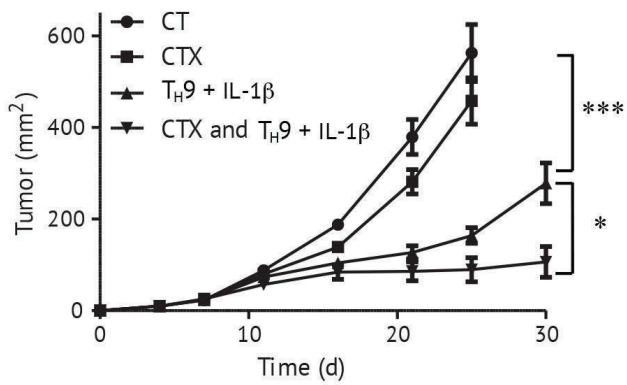
WT mice were injected i.v. with B16F10 melanoma cells. CD4 T cells were stained using anti-CCR3, anti-CXCR3, anti-CCR6 and anti-CCR4 antibodies and sorted from the tumor draining lymph nodes of tumor-bearing mice. *Il9*, *Ifng* and *Il17* expression was interrogated in CD4<sup>+</sup> CCR3<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CCR4<sup>-</sup> cells (T<sub>H</sub>9) and compared to T<sub>H</sub>9 depleted total CD4<sup>+</sup> cells (CD4) using RT-PCR. \*\*P < 0.01 (Mann-Whitney test). Data are from one experiment representative of two independent experiments with similar results (mean and s.e.m. of three triplicates).



### Supplementary Figure 5

IL-1 $\beta$ -driven IL-9 and IL-21 secretion in T<sub>H9</sub> cells depends on Fyn but not NF- $\kappa$ B.

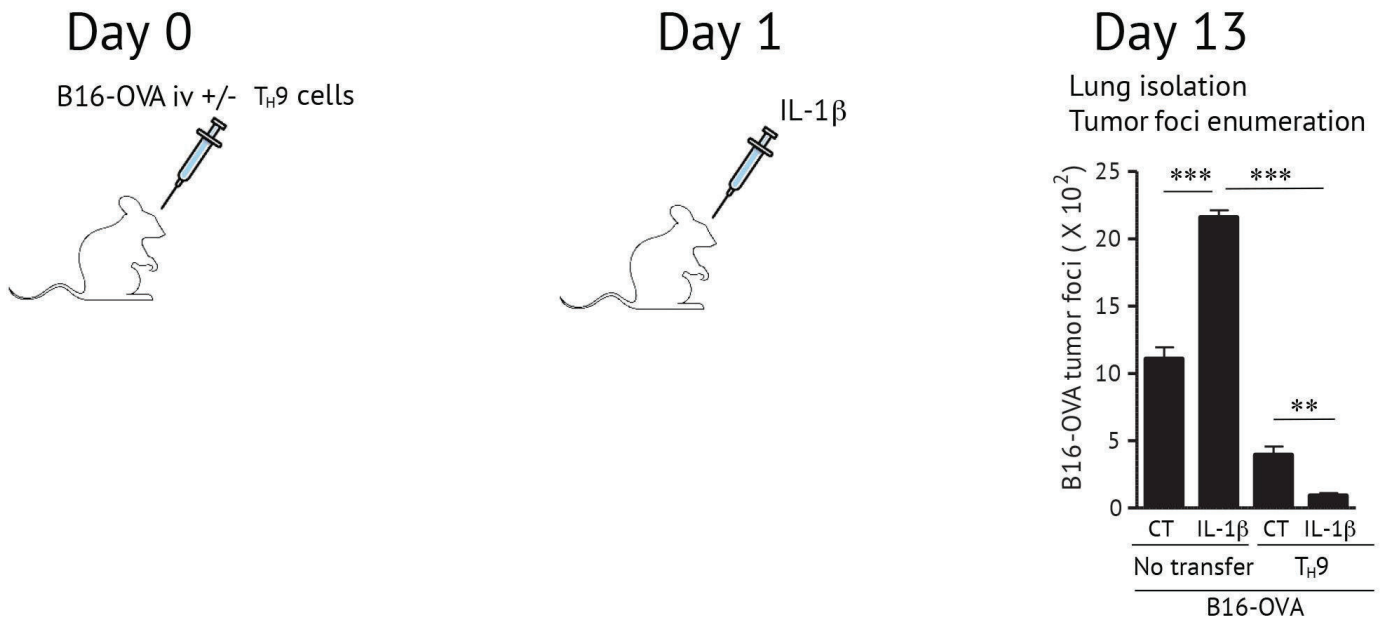
**a**) Naive CD4 T cells were differentiated into T<sub>H0</sub> or T<sub>H9</sub> cells in the presence or absence of IL-1 $\beta$  without or without 10 nM bortezomib (Veh: Vehicle; Bor: Bortezomib). IL-9 and IL-21 secretion was determined by ELISA after a 3-day culture **b**) Wild-type naive CD4 T cells transfected with control (CT) or Fyn siRNA were differentiated into T<sub>H0</sub> or T<sub>H9</sub> cells with or without IL-1 $\beta$ . IL-9, IL-10 and IL-21 secretion was assessed by ELISA after a 3-day culture. \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 (Mann-Whitney test). Data are from one experiment representative of two independent experiments with similar results (mean and s.e.m. of three triplicates).



### Supplementary Figure 6

Combined therapy using cyclophosphamide and the transfer of T<sub>H</sub>9 cells induced with IL-1 $\beta$ .

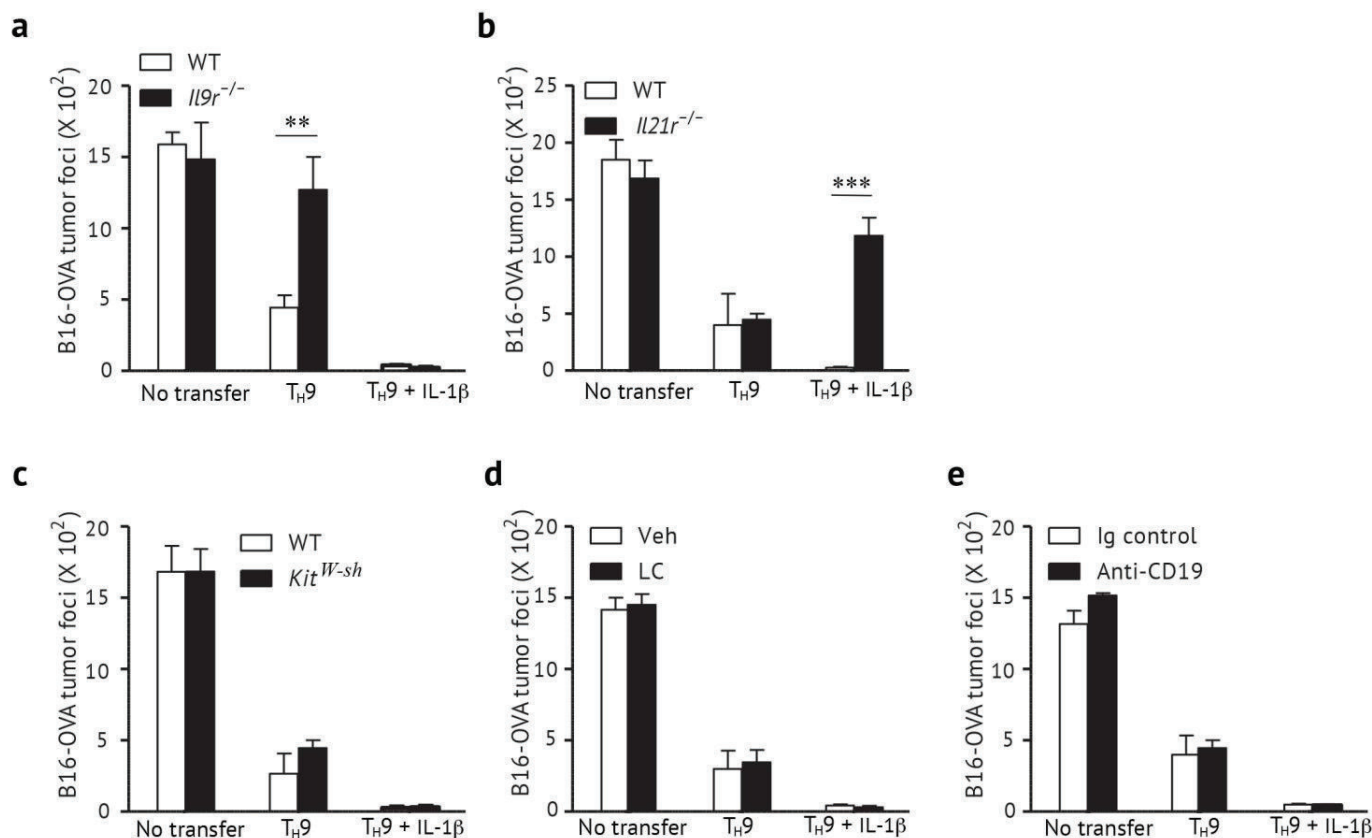
WT mice were injected s.c. with B16-OVA cells. At day 4, mice were treated with saline (CT) or cyclophosphamide (CTX). At days 5 and 10, mice were left untreated or received i.v. 2 million T<sub>H</sub>9 cells induced in the presence of IL-1 $\beta$  and tumor growth was monitored. Pooled data from two independent experiments with 5 mice per group are shown (error bars: mean and s.e.m.). \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (Left panel Mann-Whitney test; Right panel Log rank test).



### Supplementary Figure 7

IL-1 $\beta$  enhances the anticancer effect of classical  $T_H9$  cells *in vivo*.

Wild-type mice were injected iv with B16-OVA melanoma cells with or without effector OT-II  $T_H9$  cells. Twenty-four hours later, mice were treated either with IL-1 $\beta$  or PBS. Number of lung tumor foci was evaluated 13 days later. \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (Kruskal-Wallis test). Pooled data from two independent experiments with five mice per group are shown (error bars: mean and s.e.m.).



### Supplementary Figure 8

IL-21 dictates the anticancer effects of IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells.

**a**) Wild-type (WT) or *Il9r*<sup>-/-</sup> mice were injected i.v. with B16-OVA melanoma cells and effector OT-II T<sub>H</sub>9 cells differentiated with or without IL-1 $\beta$  and lung tumor foci were enumerated at day 13 **b**) Wild-type or *Il21r*<sup>-/-</sup> mice were injected i.v. with B16-OVA melanoma cells and effector OT-II T<sub>H</sub>9 cells differentiated with or without IL-1 $\beta$  and lung tumor foci were enumerated at day 13. **c**) Wild-type or *Kit*<sup>W-sh</sup> mice were injected i.v. with B16-OVA melanoma cells and effector OT-II T<sub>H</sub>9 cells differentiated with or without IL-1 $\beta$  and lung tumor foci were enumerated at day 13 **d**) Wild-type mice were injected i.v. with B16-OVA melanoma cells and effector OT-II T<sub>H</sub>9 cells differentiated with or without IL-1 $\beta$  and subsequently treated with liposomal clodronate (LC) or control liposome (Veh) day -1, 0, 1, 3 and then every 3 days following CD4 T cell transfer for macrophage depletion. Lung tumor foci were enumerated at day 13 **e**) Wild-type mice were injected i.v. with B16-OVA melanoma cells and effector OT-II T<sub>H</sub>9 cells differentiated with or without IL-1 $\beta$  and subsequently treated with anti-CD19 or Ig control day -1, 0, 1, 3 and then every 3 days following CD4 T cell transfer for B cell depletion. Lung tumor foci were enumerated at day 13. \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 (Mann-Whitney test). Data are from one experiment representative of at least two independent experiments with similar results (5 mice per group; error bars: mean and s.e.m.).

**Table 1 : Genes that were differentially expressed between T<sub>H</sub>9 (CT) and T<sub>H</sub>9+IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) cells after 1 hour differentiation.**

Gene symbol	Locus	Ref Seq	Fold Change (IL-1 $\beta$ /CT)	p-value	Function
<i>Trbc1</i>	chr16:87483864-87487613	NG_006980.1	82.70	0.00682954	Membrane receptor
<i>Nr4a3</i>	chr13:44869570-44869819	NM_015743.2	38.20	0.00081884	Transcription factor
<i>Slc38a2</i>	chr15:96695215-96698660	NM_175121.3	34.67	0.0147913	Transport of amino acids
<i>Laptm5</i>	chr11:34065098-34066066	NM_010686.3	29.95	0.00146167	Control of surface TCR expression and T cell activation
<i>Cxcr4</i>	chr1:128589309-128592241	NM_009911.3	26.71	0.0021435	Allows cells to migrate in response to a gradient of chemokine ligands
<i>Cd53</i>	chr10:42870145-42870973	NM_007651.3	26.17	0.0402329	Transduction of signals in T cells
<i>Sesn3</i>	chr3:106760015-106790050	NM_030261.4	25.67	0.0216972	Stress-induced proteins
<i>Psmb8</i>	chr17:34199652-34201351	NM_010724.2	25.46	0.0100568	Role in cytokine production
<i>Slc3a2</i>	chr1:36310143-36310671	NM_001161413.1	24.18	0.0216972	Involved in T cell activation
<i>Arid5A</i>	chr1:36310143-36310671	NM_145996.4	24.01	0.0147913	Unknown
<i>Npc2</i>	chr12:84756925-84772865	NM_023409.4	23.23	0.00463766	Cholesterol metabolism
<i>Ski</i>	chr11:62551963-62553129	NM_003036	23.04	0.0216972	Repressor of TGF $\beta$ signaling
<i>Mei2d</i>	chr11:115163507-115177263	NM_133665.3	22.60	0.0216972	Regulation of interleukin-2 gene in T lymphocytes
<i>Crlf3</i>	chr11:80047390-80058059	NM_001277106.1	22.18	0.0121695	Unknown
<i>Msn</i>	chr3:88168041-88168556	NM_010833.2	21.64	0.0118881	Cell-cell recognition and signaling and for cell movement
<i>Eif3h</i>	chr15:51790032-51842509	NM_080635.1	21.11	0.0216972	Translation initiation factor
<i>Rbck1</i>	chr1:80745583-80746273	NM_001083921.1	20.53	0.0216972	E3 ubiquitin protein ligase
<i>Dock10</i>	chr1:80745583-80746273	NM_175291.3	19.9	0.00682954	Interleukin-4-inducible gene
<i>Crem</i>	chr18:3280445-3281096	NM_001110859.2	19.80	0.0100568	Epigenetic remodeling of the IL2 gene through the recruitment of DNMT3
<i>Tap1</i>	chr17:34187790-34189254	NM_013683.2	18.31	0.0100568	Role in antigen processing
<i>Ube2b</i>	chr11:51996924-51997619	NM_009458.4	18.20	0.0100568	Ubiquitin ligase
<i>Lcp1</i>	chr14:75198067-75215199	NM_001247984.1	18.20	0.000117	Hematopoietic cell differentiation
<i>Flna</i>	chr3:52268997-52345457	NM_010227.2	17.65	0.0216972	Cell shape and migration
<i>Ankrd17</i>	chr15:80931344-80932148	NM_030886.2	17.54	0.0216972	Protein-protein interactions
<i>Tmem64</i>	chr11:53771035-53771640	NM_181401.3	16.94	0.00463766	Unknown
<i>Xyl1l</i>	chr18:3280445-3281096	NM_175645.3	16.83	0.0216972	Glycosyltransferase
<i>Slc9a3r1</i>	chr11:115163507-115177263	NM_012030.2	16.66	0.0216972	Immune synapse formation in T cells
<i>Smad7</i>	chr1:138063482-138099532	NM_005904	16.54	0.0147913	Negative regulator of TGF $\beta$ signaling
<i>Chd2</i>	chr2:15055338-15056358	NM_001081345.2	16.51	0.0147913	Helicase
<i>D4wst53e</i>	chr11:51996924-51997619	NM_023665.3	16.15	0.00207152	Unknown
<i>Zeb1</i>	chr1:128589309-128592241	NM_011546.3	15.68	0.0147913	Regulation of interleukin-2 expression in T-lymphocytes
<i>Fosl2</i>	chr15:79727549-79734153	NM_008037.4	14.59	0.00018374	Regulators of cell proliferation, differentiation
<i>Irf1</i>	chr11:53771035-53771640	NM_002198	14.52	0.0460635	T <sub>H</sub> 1 transcription factor
<i>Sun2</i>	chr15:79727549-79734153	NM_015374	14.30	0.000994	Regulation of nuclear positioning in differentiating cells
<i>Rbm39</i>	chr10:128624559-128626238	NM_133242.2	14.22	0.00556154	Splicing factors
<i>Satb1</i>	chr17:51815102-51815840	NM_002971	14.06	0.0216972	Maturation of the immune T-cell

<i>Stat1</i>	chr1:52159298-52160158	NM_007315	13.99	0.0100568	Signal transduction
<i>Spn</i>	chr18:75368264-75368964	NM_009259.4	13.46	0.0100568	Sialoglycoprotein
<i>Runx1</i>	chr16:92808379-92809211	NM_001122607	13.35	0.0147913	Differentiation of T cells
<i>Aff1</i>	chr14:121953845-121965109	NM_001080798.1	13.24	0.0216972	Role for AFF1 in lymphopoiesis
<i>Foxo1</i>	chr10:53981665-53982761	NM_019739.3	13.12	0.0147913	Enhances TLR4-mediated signalling
<i>Sng1</i>	chr18:5607151-5607881	NM_001031814.1	12.66	0.031718	Nonsense-mediated mRNA decay
<i>Tnrc6b</i>	chr15:80931344-80932148	NM_144812.2	12.65	0.0216972	MicroRNA-guided mRNA cleavage
<i>Gpr183</i>	chr14:121953845-121965109	NM_183031.2	12.61	0.0121695	G protein-coupled receptor
<i>Scn14</i>	chr10:42870145-42870973	NM_172938.3	12.20	0.0216972	Unknown
<i>Cblb</i>	chr16:52031600-52112121	EF442243.1	12.05	0.0216942	Prevent activation of NF-B
<i>Cct8</i>	chr16:87483864-87487613	NM_009840.3	12	0.0147913	Chaperone activity during cell cycle
<i>Hspa5</i>	chr10:39414217-39415383	NM_001163434.1	11.88	0.0288145	Role in maintaining T cell viability in TCR-activated states
<i>Lep2</i>	chr11:34065098-34066066	NM_010696.3	11.13	0.0147913	Induced by TCR
<i>Chd4</i>	chr15:96695215-96698660	NM_145979.2	10.74	0.0100568	Role in epigenetic transcriptional repression
<i>H2-ab1</i>	chr17:34263317-34269482	NM_207105.3	10.45	0.0313528	Unknown
<i>Fyn</i>	chr10:39414217-39415383	NM_001122893.1	9.78	0.0100568	T cell signaling regulation
<i>Cd37</i>	chr19:8713469-8713960	NM_007645.4	9.60	0.00315024	Role in T-cell-B-cell interactions
<i>Bach2</i>	chr11:68902379-68904524	D86604.1	9.56	0.00682954	Inhibition of effector memory-related genes
<i>Ar15b</i>	chr1:52159298-52160158	NM_029466.4	9.52	0.0216972	Cell growth regulation and signal transduction
<i>Eif2g2</i>	chr17:51815102-51815840	NM_001040131.2	9.43	0.0149528	Translation initiation
<i>Foxp1</i>	chr17:34199652-34201351	NM_053202.2	9.37	0.0100568	Forkhead box transcription factor
<i>Man1a</i>	chr10:53981665-53982761	NM_008548.4	8.75	0.0216972	Catalyzer of terminal mannose residues
<i>Arhgap1b</i>	chr16:52031600-52112121	NM_007486.4	6.54	0.0241795	Rho protein family
<i>Hexb</i>	chr13:97190542-97190634	NM_010422.2	6	0.0216972	Glycoconjugate degradation in lysosomes
<i>Zc3hav1</i>	chr16:52139526-52164385	NM_028421.1	5.88	0.0217994	Zinc finger protein
<i>Piprc</i>	chr1:138063482-138099532	NM_001268286.1	5.26	0.0178788	T-lymphocyte function, maturation and differentiation
<i>Seip1g</i>	chr14:75198067-75215199	NM_009151.3	3.18	0.0150335	Role in leukocyte trafficking
<i>Rac2</i>	chr15:78560917-78572759	NM_002872	3.09	0.0245465	Rho family of GTPase
<i>Ubb</i>	chr11:62551963-62553129	NM_011664.3	2.74	0.0474079	Ubiquitin ligase
<i>Vps37b</i>	chr15:78560917-78572759	NM_177876.4	2.59	0.0457002	Unknown
<i>Cnbp</i>	chr17:34187790-34189254	NM_013493.3	2.40	0.0477112	Translation initiation



**Table II : Gene expression comparison of classical and IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells before and after *in vivo* transfer.**

Naive CD4 T cells were differentiated *in vitro* into classical and IL-1 $\beta$ -induced T<sub>H</sub>9 cells for three days. Differentiated cells were then transferred into mice and recovered six days later. RNAseq analysis was subsequently performed before and after transfer.

Fold change expression of T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and, T<sub>H</sub>17 genes is shown (only the genes which expression was detected are presented).

<b>Fold change</b>	<b>T<sub>H</sub>9 <i>in vivo</i>/T<sub>H</sub>9 <i>in vitro</i></b>	<b>T<sub>H</sub>9 + IL-1<math>\beta</math> <i>in vivo</i>/T<sub>H</sub>9 + IL-1<math>\beta</math> <i>in vitro</i></b>
<b>T<sub>H</sub>1 genes</b>		
<i>Il18r1</i>	1.74	10.93
<i>Ccr5</i>	1.04	5.94
<i>Irf1</i>	0.94	2.66
<i>Tbx21</i>	0.74	2.16
<i>Cxcr3</i>	2.44	2.04
<i>Stat1</i>	0.59	1.94
<i>Il12rb2</i>	1.3	1.54
<i>Tnf</i>	0.88	1.41
<i>Stat4</i>	1.36	1.4
<i>Il27ra</i>	0.96	1.24
<i>Csf2</i>	0.77	1.24
<i>Soes5</i>	0.41	1.22
<i>Ifng</i>	0.26	1.04
<i>Cd28</i>	0.97	0.87
<i>Socs1</i>	1.12	0.78
<i>Cd40lg</i>	0.68	0.71
<i>Il2</i>	0.74	0.64
<b>T<sub>H</sub>2 genes</b>		
<i>Ccl5</i>	8.48	7.06
<i>Maf</i>	0.95	2.77
<i>Jumb</i>	1.44	2.57
<i>Il5</i>	1.7	1.94

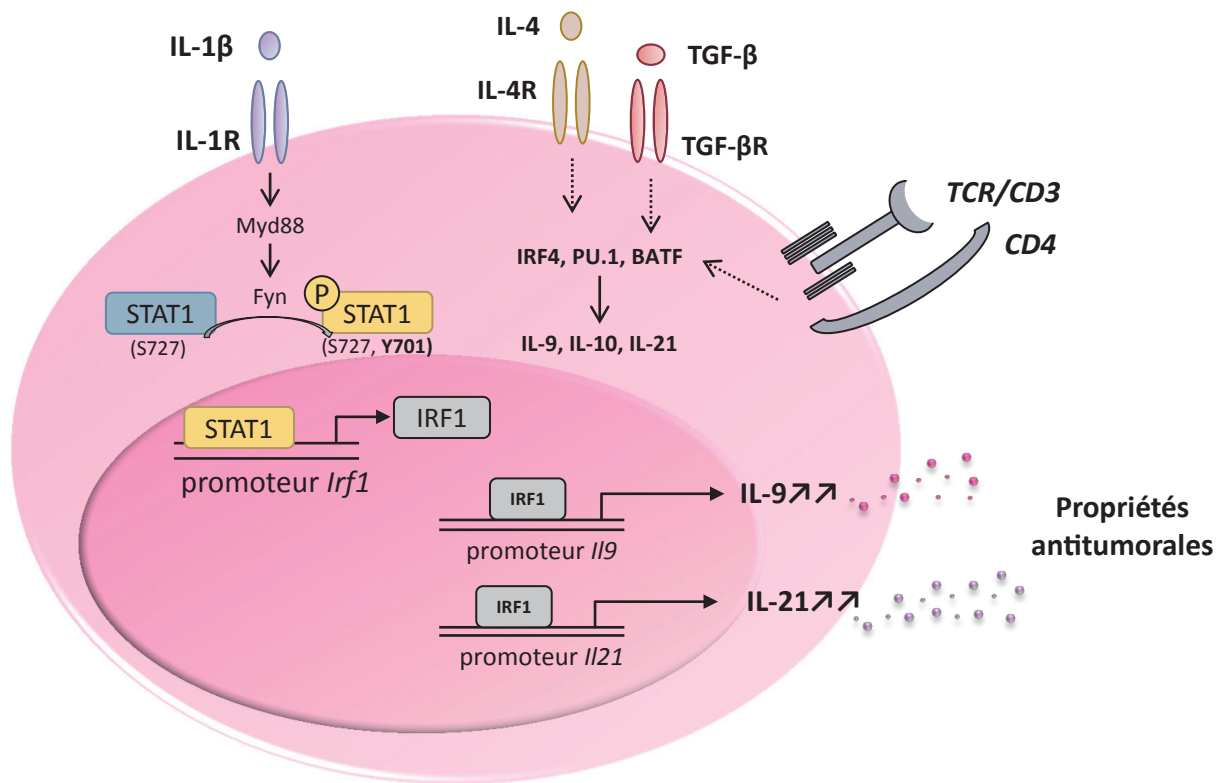
<i>Jak1</i>	1.17	1.6
<i>Il10</i>	0.44	1.59
<i>Cebpb</i>	0.93	1.47
<i>Gfi1</i>	0.91	1.46
<i>Il13</i>	1.18	1.12
<i>Il1r1</i>	0.96	0.98
<i>Nfatc1</i>	1.76	0.96
<i>Il4ra</i>	1.05	0.91
<i>Jak3</i>	1.5	0.88
<i>Ccr4</i>	0.92	0.73
<i>Gata3</i>	1.1	0.58
<i>Icos</i>	0.96	0.54
<i>Il4</i>	1.2	0.29
<b>T<sub>H</sub>17 genes</b>		
<i>Il1b</i>	17.18	14.42
<i>Il18</i>	1.56	6.75
<i>Ccl20</i>	1.54	3.27
<i>Il6</i>	1.33	2.47
<i>Tgfb3</i>	0.19	2.14
<i>Il1a</i>	1.3	1.09
<i>Rorc</i>	0.86	1.08
<i>Tgfb1</i>	0.83	0.82
<i>Lta</i>	0.68	0.73
<i>Batf</i>	1	0.6
<i>Il17a</i>	2.5	0.57
<i>Il22</i>	0.33	0.43
<i>Stat3</i>	2.31	0.33

## Conclusion

Ces travaux ont permis :

- ✓ de caractériser les effets de l'IL-1 $\beta$  sur le programme moléculaire des cellules Th9,
- ✓ de déterminer l'impact de l'IL-1 $\beta$  sur l'activité antitumorale des lymphocytes Th9,
- ✓ de démontrer que sous l'influence de l'IL-1 $\beta$ , le facteur de transcription IRF1 se comporte véritablement comme un activateur du programme Th9 et autorise la production d'IL-21 par ces cellules ; IRF1 est donc responsable des puissantes fonctions antitumorales de ces cellules.

Cette étude montre comment renforcer les fonctions effectrices antitumorales de cellules T CD4 en modulant une fois encore leur activité *in vitro*.



## Cellule Th9 en cours de différenciation

Figure 17. Rôle d'IRF1 dans le programme transcriptionnel des cellules Th9.

### III. Article 3 en préparation

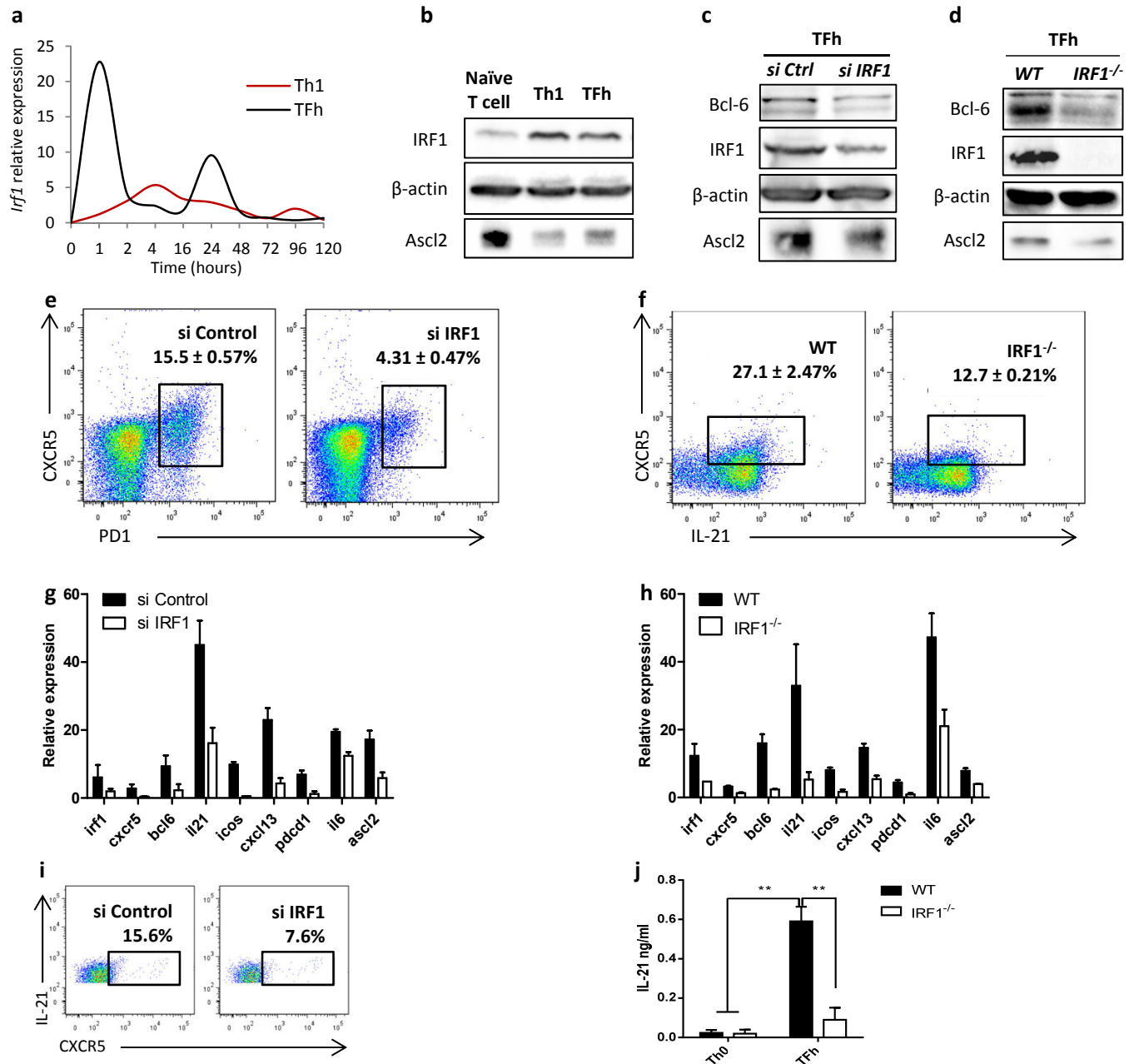
« Étude de la régulation transcriptionnelle des cellules T CD4 folliculaires : application en immunothérapie anticancéreuse. »

Les cellules T folliculaires helper (TFh) ont été récemment décrites comme un nouveau sous-type lymphocytaire associé à un meilleur pronostic des cancers. Les mécanismes responsables de leur rôle dans le rejet des tumeurs restent toutefois mal caractérisés. Nos données suggèrent que les propriétés anticancéreuses des lymphocytes TFh seraient contrôlées par l'expression d'IRF1, un facteur de réponse aux interférons très précocement exprimé par ces cellules. IRF1 a été initialement identifié comme un facteur de transcription spécifique des cellules Th1. Ainsi, l'identification du facteur de transcription IRF1 dans la biologie des cellules TFh représenterait non seulement une avancée conceptuelle majeure dans la compréhension des mécanismes de la différenciation des lymphocytes T mais procurerait également une cible pour moduler l'activité des cellules T CD4 dans un but thérapeutique. Par des approches de transfert passif de cellules menées chez l'animal, nous espérons en effet démontrer le rôle central d'IRF1 dans le contrôle de la progression tumorale. S'il s'avère que l'activité transcriptionnelle d'IRF1 est essentielle aux fonctions effectrices des lymphocytes TFh, cela ouvrirait alors la possibilité de leur utilisation comme outil de thérapie cellulaire chez l'Homme.

#### Traitement statistique des données

Les données ont été exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. La comparaison intergroupe a fait appel à une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie d'un test de Tukey. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism*. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.

**Figure 1.** L'expression d'IRF1 est requise pour induire la différenciation des TFh *in vitro* et *in vivo*.



**a)** Des lymphocytes T naïfs ont été activés en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et d'IL-6 (TFh, en noir) ou d'IL-12 (Th1, en rouge). Le niveau d'expression d'*irf1* a été évalué par qPCR au cours de la différenciation. **b)** L'expression de la forme totale d'IRF1 et celle d'Ascl2 ont été révélées par immuno-empreinte, respectivement 24h et 48h après différenciation des sous-types TFh et Th1. La condition T naïf se réfère à un état de non activation du lymphocyte T (contrôle négatif) et le  $\beta$ -actine est employée comme contrôle de charge. **c)** Des cellules T naïves sauvages ont été traitées 24h en présence d'un siRNA contrôle ou dirigé contre IRF1 puis différenciées en TFh afin de révéler les expressions d'IRF1 à 24h et de Bcl-6 et d'Ascl2 à 48h. **d)** Des TFh ont été générés à partir de cellules issues de souris sauvages (WT) ou déficientes pour IRF1 (*IRF1*<sup>-/-</sup>) et les niveaux d'expression d'IRF1, de Bcl-6 et d'Ascl2 sont détectées par immuno-blotting 24h et 48h après début de polarisation. **e, h)** Des lymphocytes T naïfs issus de souris sauvages C57BL/6 (noir) ou déficientes pour IRF1 (blanc) ont été différenciés en TFh comme en **c)** et **d)**. La proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (**e**) ou T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup> (**f**) a été évaluée par cytométrie en flux après 72h de différenciation *ex vivo*. **g-h)** L'expression relative des gènes associés à la polarisation TFh a été évaluée par qPCR 24h après début de différenciation sauf pour *irf1* dont l'expression a été analysée après 1h, normalisée au niveau de  $\beta$ -actine puis comparée à celle d'un T naïf. **i)** Des TFh ont été polarisés *ex vivo* comme en **c)** et la proportion de cellules sécrétrices d'IL-21 a été examinée par un marquage intracellulaire après 48h de polarisation. **j)** Quantification de la sécrétion d'IL-21 par ELISA dans les surnageants de culture de cellules T CD4<sup>+</sup> WT (en noir) ou *IRF1*<sup>-/-</sup> (en blanc) différenciées 72h en Th0 et TFh. La condition Th0 réfère à un lymphocyte T stimulé par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en l'absence de cytokines de polarisation. Les valeurs sont indiquées en moyenne  $\pm$  ESM et sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes; \*\*  $p < 0,01$ .

## 1. L'expression d'IRF1 est requise pour induire la différenciation des TFh *in vitro* et *in vivo*

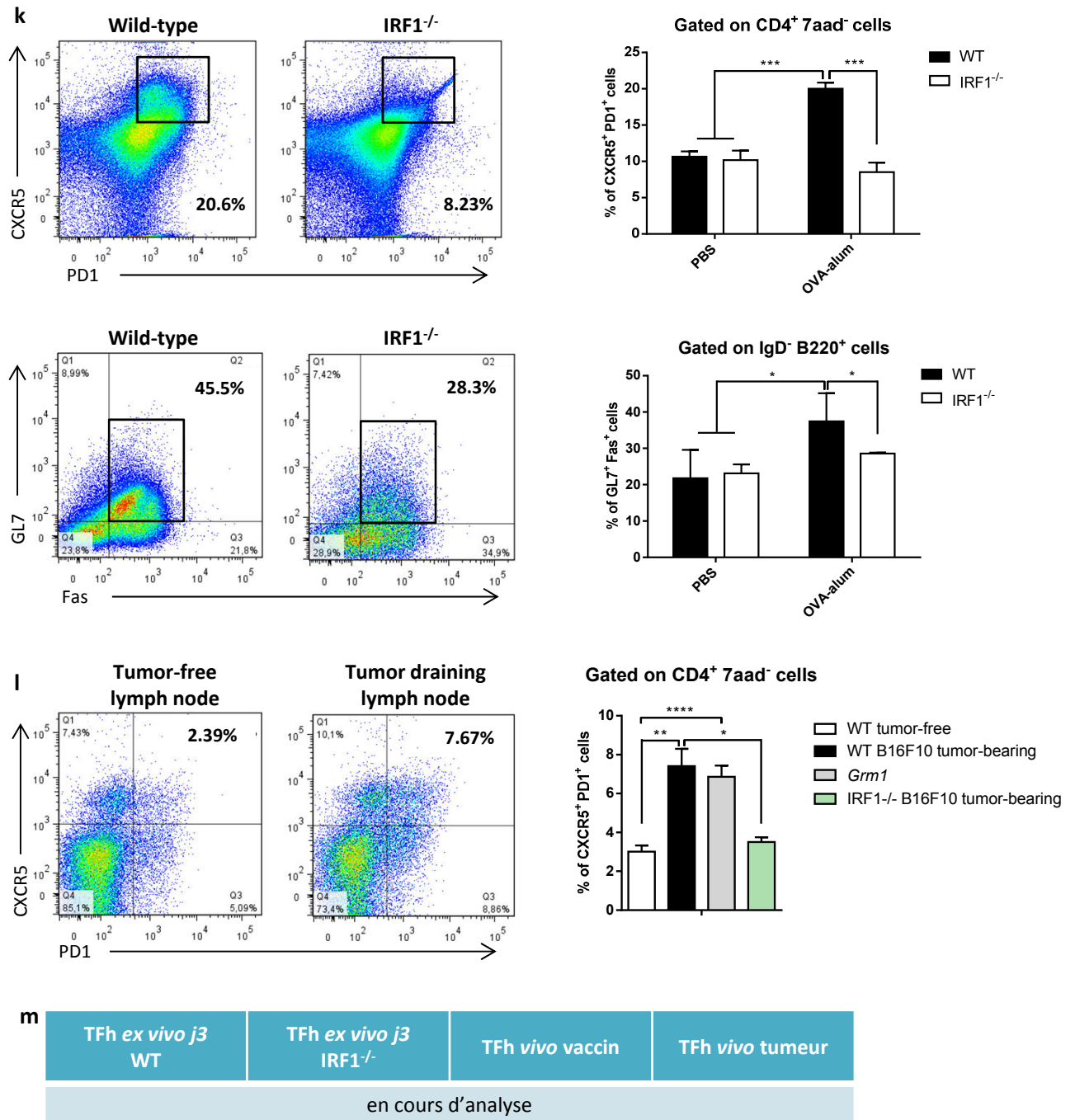
### 1.1. Hypothèse de travail

Nos premières observations ont montré une accumulation de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> dans les ganglions drainant les tumeurs implantées chez des souris C57BL/6 (mélanome B16F10 et adénocarcinome bronchique LLC1). De façon étonnante, nous avons constaté une induction précoce et forte du gène contrôlant l'expression du facteur de transcription *Interferon Regulatory Factor 1* (IRF1) au cours de la différenciation de TFh *in vitro* (Figure 1a). Or, IRF1 est un facteur de transcription initialement décrit comme essentiel à la génération de cellules Th1 fonctionnelles. L'équipe de Taniguchi a en effet démontré qu'IRF1 régulait directement l'expression des composantes du récepteur à l'IL-12 et maintenait ainsi la sensibilité des Th1 à l'IL-12 et donc leurs fonctions effectrices (Kano *et al.*, 2008). Nous montrons ici que la cinétique d'expression d'IRF1 des cellules TFh diffère sensiblement de celle suivie par les Th1 et qu'IRF1 est induit au niveau protéique dans les TFh (Figures 1a-b). Par ailleurs, nous montrons que la différenciation *ex vivo* permet effectivement de générer des TFh puisque ces cellules expriment Bcl-6 (Figures 1c-d). C'est sur l'ensemble de ces observations que s'est fondée notre hypothèse de travail selon laquelle IRF1 jouerait un rôle central dans la génération du profil TFh.

### 1.2. Détermination du rôle d'IRF1 dans la différenciation T CD4 folliculaire *in vitro*

Afin de caractériser l'influence d'IRF1 dans la polarisation TFh, nous avons différencié des TFh à partir de T naïfs isolés de souris sauvages C57BL/6 ou déficientes pour IRF1. En l'absence d'IRF1, le profil d'expression génique impliqué dans la polarisation TFh est bloqué (Figure 1h) suggérant qu'IRF1 joue un rôle central dans le développement de la différenciation TFh. Ces données ont été corrélées à une moindre expression de CXCR5 (Figure 1e) et de Bcl-6 (Figure 1d) ainsi qu'à une diminution du niveau de production d'IL-21 par les TFh issus de souris IRF1<sup>-/-</sup> comparativement au profil sauvage (Figure 1j). L'analyse qPCR de l'expression des gènes spécifiques des autres sous-types T CD4 (Tbx21, Gata3, Rorc et Foxp3) nous a permis d'exclure tout phénomène de transdifférenciation des TFh induits *in vitro*. Une technique développée dans l'équipe a permis l'utilisation d'un siRNA dirigé contre *Irf1* qui a finalement validé l'influence d'IRF1 dans la génération de cellules TFh *in vitro* (Figures 1c, e, g, i).

**Figure 1.** L'expression d'IRF1 est requise pour induire la différenciation des TFh *in vitro* et *in vivo*.



**k)** Des souris sauvages (WT) ou invalidées pour IRF1 (IRF1<sup>-/-</sup>) ont reçu une injection intra-péritonéale d'une solution d'alum et d'ovalbumine hapténisée (100 µg). Huit jours après vaccination, les cellules T CD4<sup>+</sup> ont été isolées à partir des splénocytes puis la proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (TFh) a été évaluée par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage membranaire (panel haut). De même, les cellules non T CD4<sup>+</sup> ont subi un marquage dirigé contre les molécules IgD, B220, GL7 et Fas permettant d'estimer la proportion de cellules B activées (panel bas). **l)** Des cellules tumorales B16F10 ont été implantées par voie sous-cutanée à des souris C57BL/6 ou IRF1 KO. La proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> présentes dans les ganglions drainant les tumeurs a été évaluée par cytométrie en flux 10 jours après injection des cellules tumorales ou chez des souris présentant spontanément des tumeurs cutanées (souris Grm1). **l)** Des cellules tumorales B16F10 ont été implantées par voie sous-cutanée à des souris C57BL/6 ou IRF1 KO. La proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> présentes dans les ganglions drainant les tumeurs a été évaluée par cytométrie en flux 10 jours après injection des cellules tumorales ou chez des souris présentant spontanément des tumeurs cutanées (souris Grm1). **m)** Analyse RNA-seq comparant les profils transcriptomiques de cellules TFh différenciées 3 jours *ex vivo* à partir de cellules T naïves issues d'un fonds sauvage ou IRF1<sup>-/-</sup> et de cellules TFh induites *in vivo* après vaccination ou croissance tumorale (B16F10) et triées par cytométrie en flux respectivement 8 et 10 jours après injection. Les valeurs sont indiquées en moyenne ± ESM et sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes (n=3 individus par groupe minimum); \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 et \*\*\*\* p < 0,0001.

### 1.3. Validation du rôle d'IRF1 sur le profil TFh in vivo

Pour s'assurer de la similitude des TFh que nous avons différenciés *in vitro* avec ceux développés *in vivo*, nous avons induit ces derniers *in vivo* dans des souris sauvages ou IRF1<sup>-/-</sup> selon un protocole décrit par l'équipe de Shane Crotty (Johnston *et al.*, 2009). Huit jours après injection intra-péritonéale d'une solution d'alum et d'ovalbumine hapténisée, nous avons isolé les cellules T CD4<sup>+</sup> à partir des splénocytes puis caractérisé les TFh par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage membranaire CD4, CXCR5, PD-1. Les cellules non T ont été marquées à l'aide d'un panel d'anticorps dirigés contre les marqueurs IgD, B220, GL7 et Fas permettant de caractériser les cellules B activées retrouvées dans le centre germinatif (*GC B cells*). La capacité à générer une réponse T et B folliculaire après vaccination est atténuée chez les souris déficientes pour IRF1 par rapport à leurs homologues sauvages (Figure 1k, panels haut et bas). Finalement, nous n'observons pas d'induction de TFh dans les ganglions drainant les tumeurs implantées chez des souris IRF1<sup>-/-</sup> (B16F10) contrairement aux souris sauvages porteuses de tumeurs induites après transplantation ou spontanément (souris *Grm1*) (Figure 1l). Ces expériences soulignent le rôle initiateur d'IRF1 dans la polarisation TFh. Au regard de ces résultats, nous nous attendons à ce que le profil d'expression des cellules TFh générées *in vitro* et *in vivo* soit similaire après comparaison de leurs profils transcriptomiques par RNA-seq (Figure 1m, en cours d'analyse). L'expression des gènes signant le sous-type TFh devra également être confirmée par qPCR.

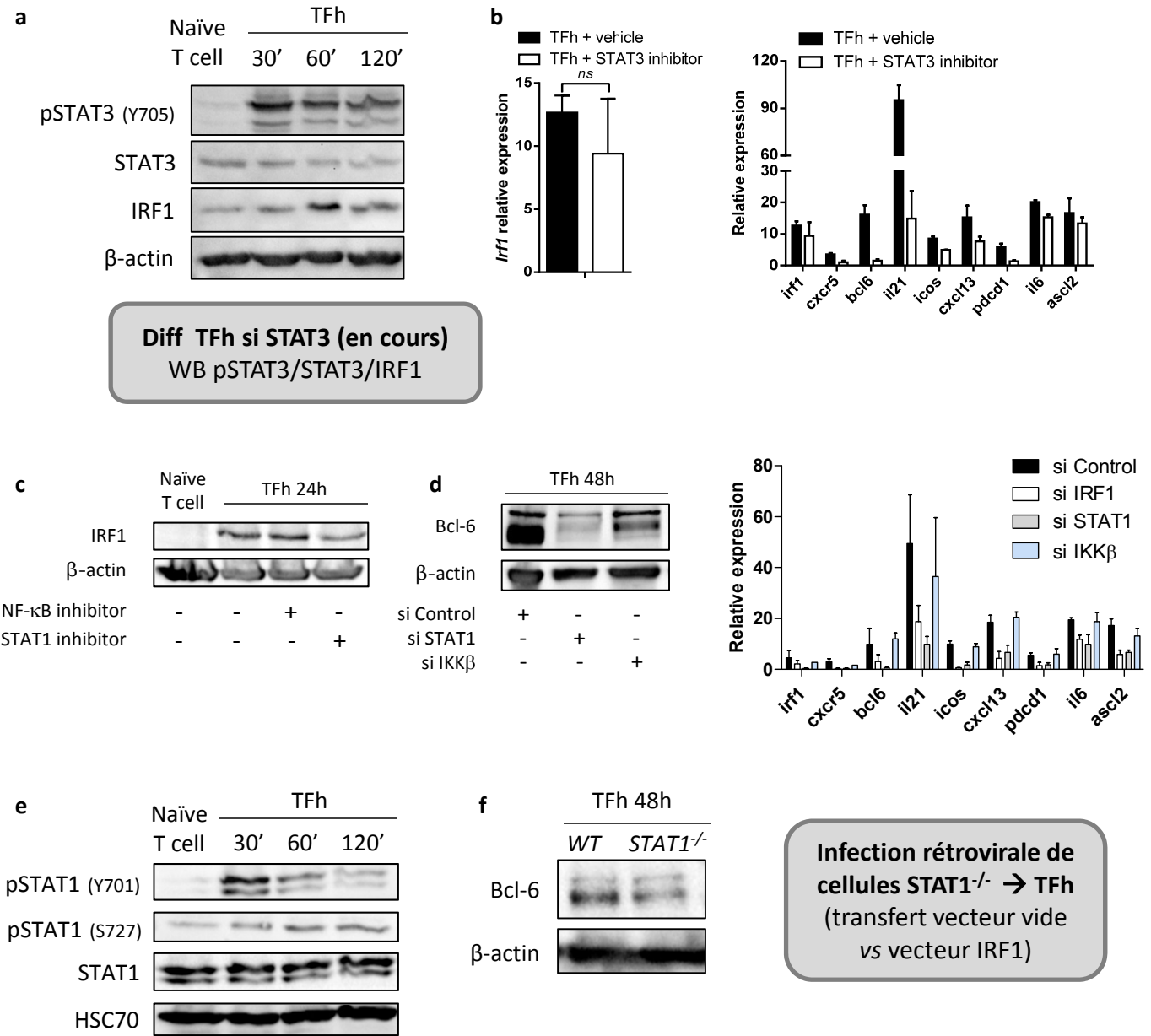
## **2. L'expression d'IRF1 est dépendante de l'activation de STAT1**

### 2.1. Exploration de la voie de signalisation de STAT3 dans les cellules TFh

L'induction de cellules TFh se fait en présence d'IL-6. Après liaison de l'IL-6 à son récepteur (IL-6R), ce dernier transduit le signal *via* la voie des protéines JAK/STAT et active principalement STAT3, et ce de façon très précoce (Figure 2a). Bien que l'analyse qPCR montre un profil d'expression génique affecté dans les cellules TFh après inhibition pharmacologique de STAT3 (Figure 2b, panel de droite), ce traitement n'a cependant pas d'effet significatif sur l'expression d'*Irf1* dans ces cellules (Figure 2b, panel de gauche). Nous nous attendons à ce que ce résultat soit confirmé après analyse du niveau d'expression protéique d'IRF1 par Western Blot dans des cellules TFh différenciées après extinction de *Stat3* par stratégie de siRNA. Compte tenu de l'activation d'IRF1 dans les cellules TFh dès 60



**Figure 2.** L'expression d'IRF1 est contrôlée par STAT1.



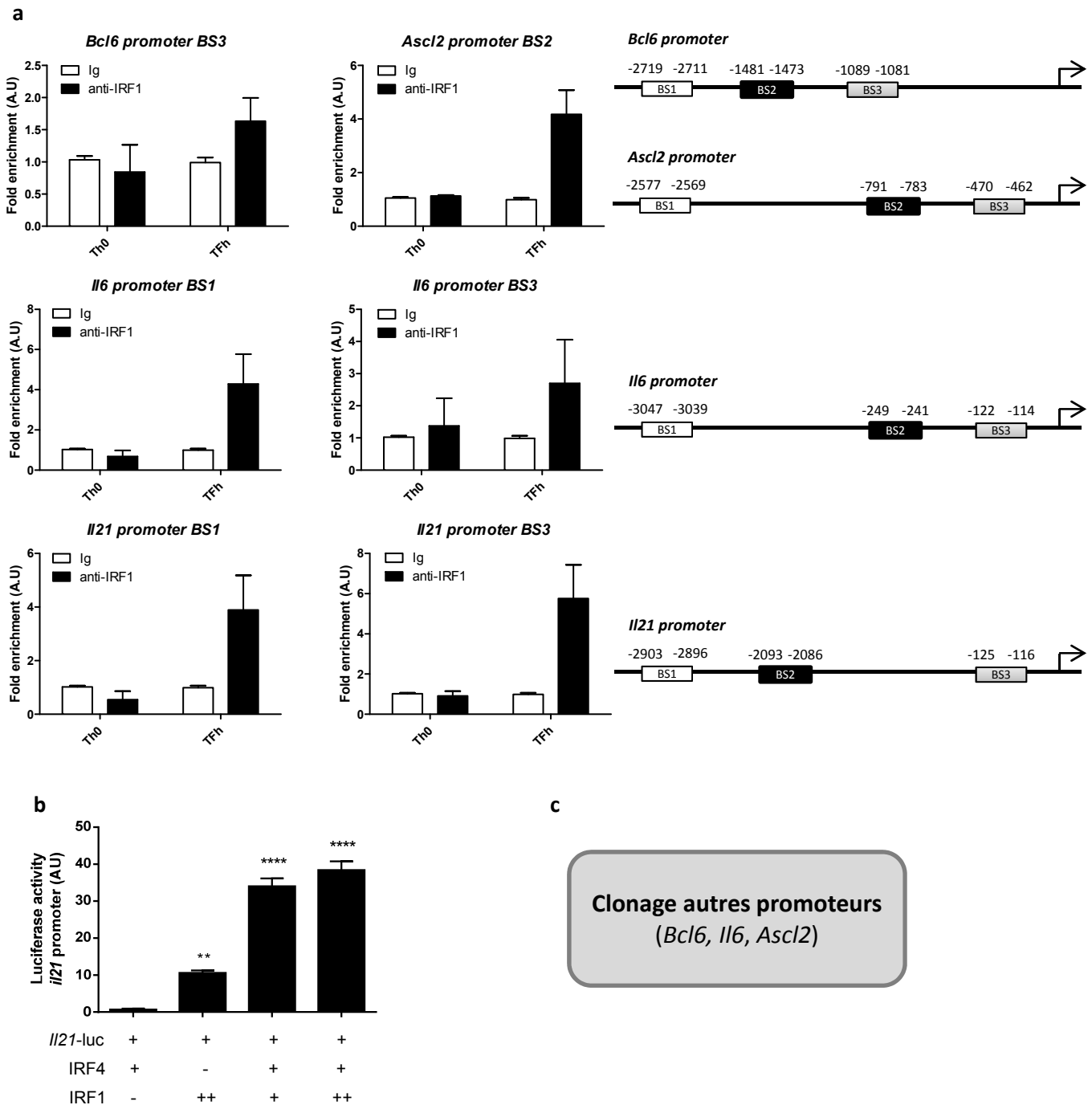
**a)** Des lymphocytes T naïfs issus de souris sauvages C57BL/6 ont été différenciés en TFh. La révélation par western blotting des niveaux d'expression de phospho-STAT3 (Y705) ainsi que des formes totales de STAT3 et d'IRF1 ont eu lieu 30 min, 60 min et 120 min après début de polarisation *ex vivo*. Le β-actine est employée comme contrôle de charge. **b)** Des TFh ont été générés classiquement ou en présence d'un inhibiteur pharmacologique de STAT3 (STA21, 10 μM). L'expression relative des gènes associés à la polarisation TFh a été évaluée par qPCR 24h après début de différenciation sauf pour *irf1* dont l'expression a été analysée après 1h, puis comparée à celle d'un T naïf. Les valeurs d'expression génique ont été normalisées par rapport au niveau de β-actine. Les valeurs sont indiquées en moyenne ± ESM et sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes. **c)** Immuno-empreinte d'IRF1 dans des cellules T CD4<sup>+</sup> polarisées 24h en TFh en présence ou non d'un inhibiteur pharmacologique ciblant soit NF-κB (bortézomib, 10 nM) soit STAT1 (SU6656, 170 nM). **d)** Immuno-blotting de Bcl-6 (panel de gauche) et analyse par RT-PCR des gènes signant le sous-type TFh (panel de droite) de cellules T CD4<sup>+</sup> différenciées 1h (*irf1*), 24h (autres gènes) et 48h après transfection par un siRNA (25 nM) contrôle ou spécifiquement dirigé contre IRF1, STAT1 ou IKKβ (sous-unité catalytique du complexe IKK impliqué dans l'activation de NF-κB). **e, f)** Des lymphocytes T naïfs issus de souris sauvages C57BL/6 (WT) ou invalidées pour STAT1 (STAT1<sup>-/-</sup>) ont été induits en TFh en présence d'IL-6 comme en **a)**. **e)** Les niveaux d'expression de phospho-STAT1 (Y701 et S727), de STAT1 totale et d'IRF1 ont été détectés par immuno-empreinte 30 min, 60 min et 120 min après différenciation. **f)** La révélation du niveau d'expression de Bcl-6 a lieu à 48h par western blotting. Le β-actine ou HSC70 sont employées comme contrôle de charge.

minutes de différenciation, nous avons cherché à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de ce facteur de transcription au cours de leur polarisation.

### 2.2 Caractérisation de la voie d'induction d'IRF1 dans les cellules TFh

La littérature rapporte que l'IL-6 est également un signal d'activation de STAT1 (Tormo *et al.*, 2012). En outre, STAT1 est décrit comme un régulateur direct d'IRF1 de même que NF- $\kappa$ B. Des expériences de différenciation TFh en présence ou non d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant STAT1 ou NF- $\kappa$ B ont permis de mettre en évidence un plus faible niveau d'expression d'IRF1 uniquement dans les cellules TFh où STAT1 est inhibé (Figures 2c et 2d, panel de gauche). Ce résultat est soutenu par le fait que le profil de gènes signant le programme TFh, de même que le niveau d'expression de Bcl-6, sont régulés à la baisse après extinction de STAT1 mais pas lorsque la voie NF- $\kappa$ B est inactivée (Figure 2d, panel de droite). Nous avons ensuite examiné le niveau de phosphorylation de STAT1 dans les cellules TFh à des temps précoces de leur différenciation. Nous montrons que l'activation de STAT1 se fait rapidement par phosphorylation sur son résidu Tyr 701 tandis que la phosphorylation sur son résidu Sér 727 reste constitutivement exprimée à un état basal (signal d'activation du TCR) (Figure 2e). De plus, les TFh générés *in vitro* à partir d'un fonds génétique déficient pour STAT1 présentent une plus faible expression de Bcl-6 par rapport aux TFh standards (Figure 2f), suggérant donc que STAT1 serait un élément capital dans la génération de TFh fonctionnels. Grâce à cette série d'expériences, nous démontrons que l'induction d'IRF1 au cours de la polarisation TFh est dépendante de l'activation de STAT1 elle-même déclenchée après stimulation de l'IL-6R. Enfin, nous prévoyons d'infecter des cellules T CD4 naïves isolées de souris STAT1<sup>-/-</sup> par un vecteur rétroviral vide ou sur-exprimant IRF1 puis de les différencier en TFh. Nous anticipons que l'infection rétrovirale d'IRF1 permette de restaurer le programme transcriptionnel des TFh et démontrer ainsi le contrôle transcriptionnel d'IRF1 sur leur profil de différenciation.

**Figure 3.** IRF1 dirige le programme transcriptionnel des TFh *via* la transactivation de *Bcl6*, d'*Ascl2*, d'*Il21* et d'*Il6*.



**a)** Analyse par immuno-précipitation de la chromatine de l'interaction d'IRF1 sur les promoteurs murins des gènes *Bcl6*, *Ascl2*, *Il6* et *Il21*. La position des sites d'interaction (BS pour *Binding Site*) sont indiquées sur les schémas adjacents aux graphiques et relatifs au site d'initiation de la transcription (flèches tout à droite). **b)** Expériences de gène luciférase réalisées dans des cellules 293T transfectées avec un vecteur vide, sur-exprimant IRF1 ou IRF4 et une construction contenant le promoteur de l'IL-21 en amont du gène rapporteur de la luciférase. Les valeurs sont indiquées en moyenne  $\pm$  ESM et sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  par rapport à la condition contrôle (*Il21*-luc + IRF4).

### 3. IRF1 dirige le programme transcriptionnel des TFh *via* la transactivation de *Bcl6*, *d'Ascl2*, *d'Il21* et *d'Il6*

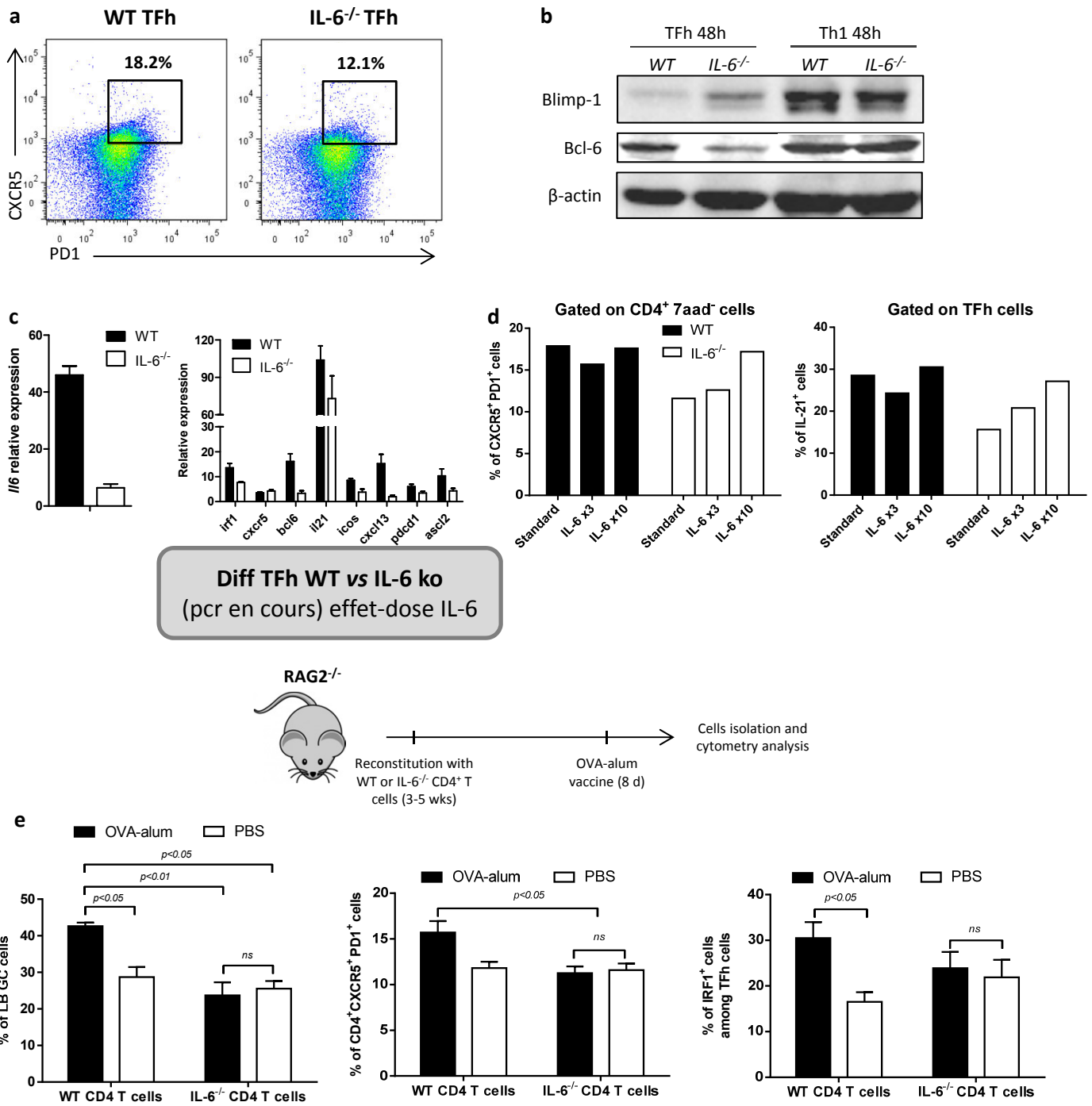
#### 3.1. Identification du rôle moléculaire d'IRF1 dans la différenciation TFh

Une analyse bio-informatique a révélé plusieurs sites d'interaction putatifs d'IRF1 sur les promoteurs de nombreux gènes impliqués dans la polarisation TFh (*Ascl2*, *Bcl-6*, *c-Maf*, *CXCR5*, *IL-21* et *IL-6*). Des expériences d'Immuno-Précipitation de la Chromatine (ChIP) (Figure 3a) ont confirmé les interactions potentielles entre IRF1 et les séquences promotrices de *Bcl6* (panel haut à gauche), *d'Ascl2* (panel haut à droite), *d'Il21* (panels du milieu) et *d'Il6* (panels bas), mais n'ont pas révélé d'interaction entre IRF1 et les promoteurs de *c-maf* ou de *Cxcr5*.

#### 3.2. Validation de l'activité transcriptionnelle d'IRF1 dans la différenciation TFh

Afin de tester et de valider nos hypothèses concernant l'activité transcriptionnelle d'IRF1 dans la différenciation cellulaire TFh, nous avons débuté des expériences de "gènes rapporteurs" à l'aide de constructions luciférase. Nous avons dans un premier temps sous-cloné la région promotrice de l'IL-21 sur laquelle IRF1 interagit dans un plasmide rapporteur couplé au gène de la luciférase. Puis, nous avons co-transfecté cette construction avec les plasmides d'expression d'IRF1 et d'IRF4 dans des cellules 293T (cellules humaines de rein embryonnaire immortalisées). IRF1 seul permet de transactiver le promoteur d'Il21, mais son action est amplifiée après coopération avec IRF4 (Figure 3b). Ces données suggèrent qu'IRF1 nécessite un cofacteur pour exercer pleinement son activité transcriptionnelle. La génération de ce modèle expérimental a permis de valider l'activité transcriptionnelle d'IRF1 sur le promoteur d'Il21. Nous poursuivons actuellement le clonage des autres séquences promotrices cibles d'IRF1 et nous attacherons à déterminer si l'action d'IRF1 sur ces séquences demande la présence d'un cofacteur.

**Figure 4.** La boucle autocrine d'IL-6 maintient le phénotype TFh.



**a)** Caractérisation phénotypique par cytométrie en flux de cellules TFh différenciées 72h *ex vivo* à partir de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves WT ou IL-6<sup>-/-</sup>. **b)** Révélation par western-blotting des niveaux d'expression de Blimp-1 et Bcl-6 à 48h de différenciation TFh. La  $\beta$ -actine est employée comme contrôle de charge. **c)** Analyse par RT-PCR de l'expression relative des gènes impliqués dans la polarisation TFh (*irf1* à 1h et l'ensemble des autres gènes à 24h) à partir de cellules issues d'un fonds WT ou IL-6 KO. Les valeurs sont indiquées en moyenne  $\pm$  ESM et sont représentatives de deux expériences indépendantes. **d)** Des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves WT ou IL-6 KO ont été différenciées en TFh de façon standard en présence de 25 ng/ml d'IL-6 ou d'une dose croissante de cette cytokine (x3 ou x10). Après 72h de culture, les cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> ont été caractérisées par cytométrie de flux et parmi elles la proportion de cellules IL-21<sup>+</sup> a été estimée. **e)** Des souris RAG2<sup>-/-</sup> ont été reconstituées avec des cellules T CD4<sup>+</sup> issues de souris sauvages ou déficientes pour l'IL-6 pendant 4 semaines avant de recevoir une injection intra-péritonéale d'OVA-alum ou de PBS en contrôle. Huit jour après vaccination ou injection de PBS, les fractions cellulaires T CD4<sup>+</sup> et non T CD4<sup>+</sup> ont été isolées puis marquées afin de caractériser les cellules TFh (panel de gauche), les cellules B activées (panel central) et les lymphocytes T exprimant IRF1 (panel de droite). Les résultats sont ici représentatifs d'une seule expérience avec n=3 individus par groupe.

## 4. La boucle autocrine d'IL-6 maintient le phénotype TFh

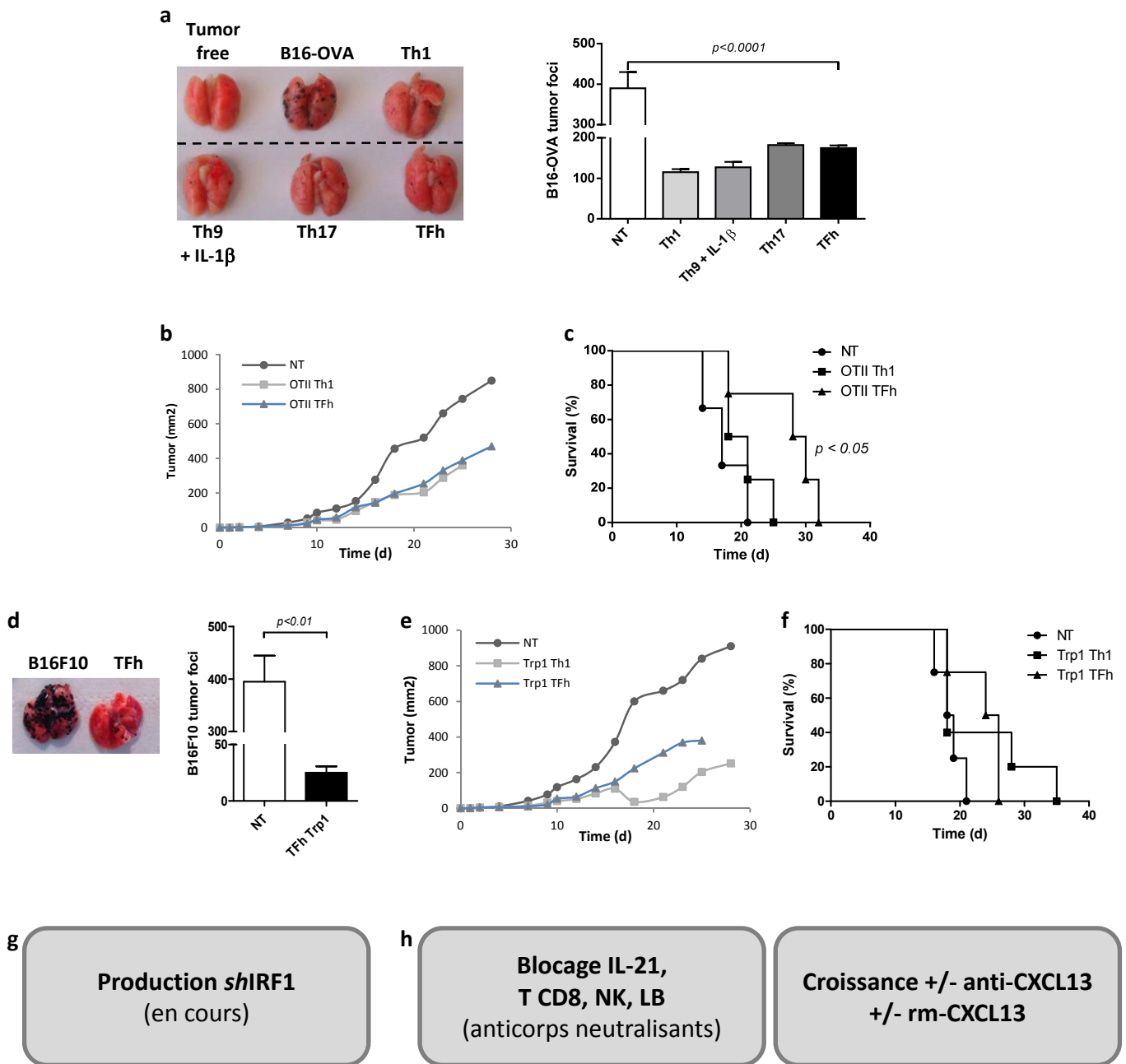
### 4.1. L'IL-6 autocrine soutient le phénotype des TFh in vitro

Pour mieux comprendre la suite des événements moléculaires engagés dans la polarisation cellulaire TFh, nous avons par la suite investigué le rôle de l'IL-6 autocrine produite par ces cellules sur le maintien de leur phénotype. Nous montrons que la différenciation TFh n'est pas optimale lorsque le gène codant pour l'IL-6 est invalidé génétiquement (Figures 4a-c). Nous caractérisons dans ce contexte une plus faible proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (Figure 4a) exprimant moins Bcl-6 que les TFh sauvages (Figure 4b) et montrons que leur programme d'expression génique est perturbé (Figure 4c). Conformément aux données de la littérature, ces données suggèrent l'implication de l'IL-6 dans l'établissement et le maintien d'un phénotype TFh fonctionnel. La caractérisation phénotypique des cellules T CD4 naïves WT ou IL-6<sup>-/-</sup> différenciées avec des doses croissantes d'IL-6 révèle qu'une forte dose d'IL-6 est capable de pallier au manque d'IL-6 imputable au fonds génétique déficient pour ce gène pour aboutir à une proportion observable chez les TFh standards (Figure 4d, panel de gauche)). Cet effet dose d'IL-6 sur les TFh IL-6<sup>-/-</sup> favorise leur production d'IL-21, pour atteindre un niveau similaire à celui des TFh contrôles (Figure 4d, panel de droite). Ainsi, une forte dose d'IL-6 parvient à restaurer un phénotype TFh fonctionnel chez les cellules IL-6 KO comparable à celui de cellules sauvages polarisées de façon standard.

### 4.2. Validation du rôle de l'IL-6 autocrine dans les TFh induits in vivo

Des souris immunodéficientes Rag2<sup>-/-</sup> (dépourvues de cellules T et B) ont été reconstituées avec des cellules T CD4<sup>+</sup> isolées de souris sauvages ou invalidées pour l'IL-6 puis vaccinées afin d'appréhender le rôle de l'IL-6 autocrine dans un contexte où les TFh sont induits *in vivo*. Cette approche valide le rôle crucial de l'IL-6 autocrine dans le maintien des fonctions effectrices des cellules TFh puisque la vaccination n'a pas d'effet sur les réponses T et B folliculaires quand les TFh sont générés à partir d'un fonds IL-6 KO (Figure 4e, panels de gauche et central). Par ailleurs, nous démontrons que les TFh effecteurs induits *in vivo* expriment IRF1 (Figure 4e, panel de droite), ce qui soutient notre hypothèse selon laquelle IRF1 contrôlerait les fonctions effectrices de ces cellules.

**Figure 5.** Les cellules TFh exercent des propriétés antitumorales.



**a)** Nombre de foyers tumoraux pulmonaires chez des souris C57BL/6 14 jours après injection intraveineuse de  $2.10^5$  cellules tumorales B16-OVA concomitamment ou non (NT : No Transfer,  $n=5$ ) au transfert adoptif de  $2.10^6$  cellules effectrices OTII polarisées 72h en Th1 ( $n=3$ ), Th9 induites en présence d'IL-1 $\beta$  ( $n=4$ ), Th17 ( $n=5$ ) ou TFh ( $n=9$ ). **b, c)** Croissance tumorale (**b**) et survie (**c**) de souris sauvages ayant reçu une injection sous-cutanée de  $2,5.10^5$  cellules B16-OVA sans aucun transfert cellulaire additionnel ou suivie d'injections intraveineuses de  $2.10^6$  de cellules OTII polarisées 72h en Th1 ou TFh 5 et 10 jours après implantation tumorale. Les résultats sont ici représentatifs d'une expérience avec au moins  $n=3$  individus par groupe. **d)** Nombre de foyers tumoraux pulmonaires chez des souris C57BL/6 13 jours après injection intraveineuse de  $2.10^5$  cellules tumorales B16F10 concomitamment ou non (NT,  $n=4$ ) au transfert adoptif de  $5.10^5$  cellules effectrices Trp1 polarisées 72h en TFh ( $n=3$ ). **e, f)** Croissance tumorale (**e**) et survie (**f**) de souris sauvages ayant reçu une injection sous-cutanée de  $2,5.10^5$  cellules B16F10 sans aucun transfert cellulaire additionnel ou suivie d'injections intraveineuses de  $5.10^5$  de cellules Trp1 polarisées 72h en Th1 ou TFh 5 et 10 jours après implantation tumorale. Les résultats sont ici représentatifs d'une expérience avec au moins  $n=3$  individus par groupe.

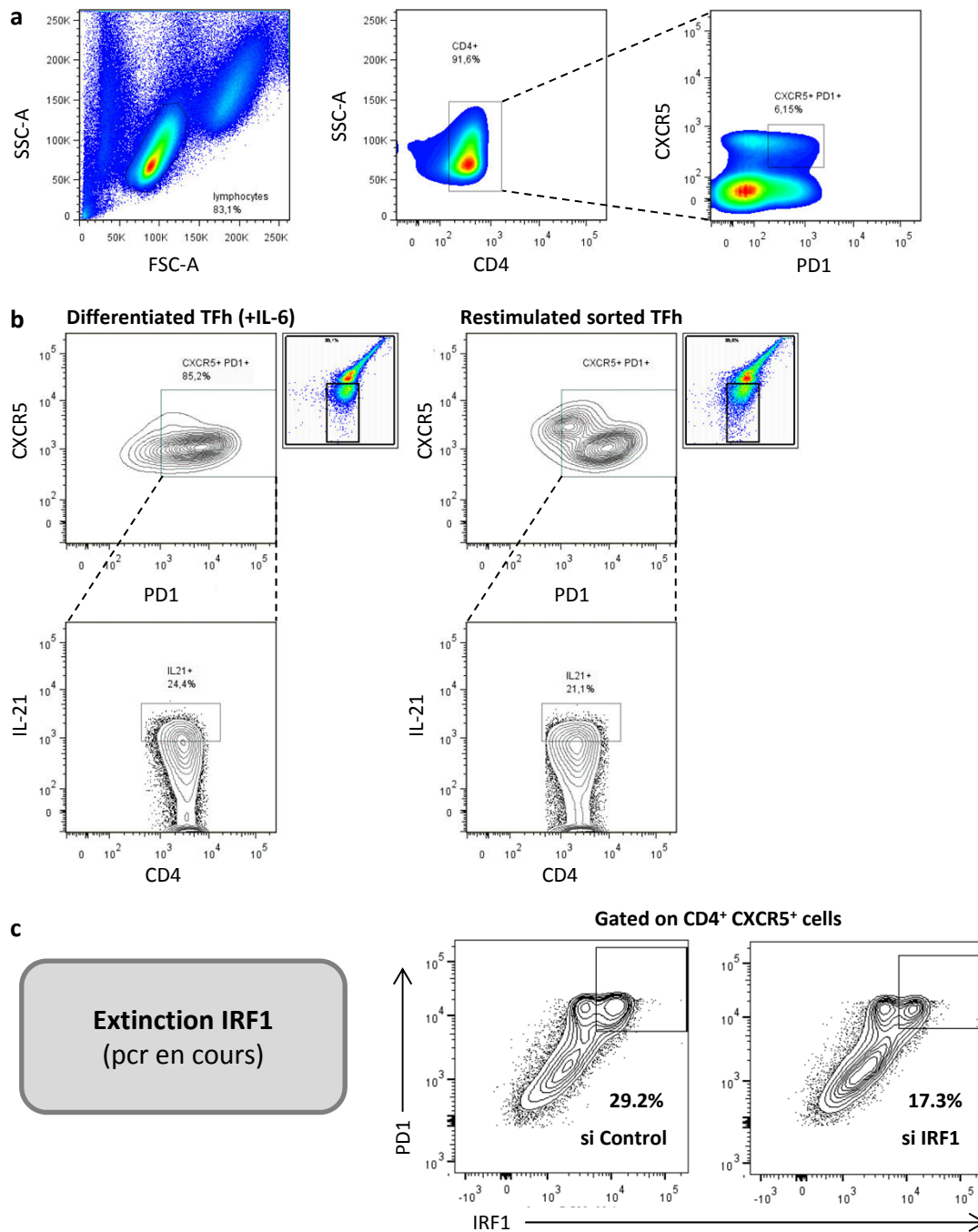
## 5. Les cellules TFh exercent des propriétés antitumorales

Pour déterminer le rôle des TFh sur la progression tumorale, nous avons réalisé des expériences de transfert adoptif de cellules TFh dans des modèles de cancers spécifiques de l'antigène. Des cellules Th1, Th9 + IL-1 $\beta$ , Th17 et TFh ont été générées 3 jours *ex vivo* à partir de T CD4 naïfs isolés de souris OTII (présentant un TCR dirigé contre l'ovalbumine) puis injectées par voie intraveineuse à des souris sauvages concomitamment à l'injection de cellules tumorales B16-OVA (mélanome murin exprimant l'ovalbumine). La détermination du nombre de foyers tumoraux présents dans les poumons des animaux porteurs 14 jours après l'injection révèle que les cellules TFh sont des effecteurs capables de limiter la croissance tumorale (Figure 5a). L'efficacité du transfert de cellules TFh est comparable à celle des sous-types effecteurs Th1 et Th17 déjà connus pour leurs fonctions antitumorales (Martin-Orozco *et al.*, 2009) et Th9 + IL-1 $\beta$  (Végran *et al.*, 2014). Afin de généraliser l'effet antitumoral des cellules TFh, nous avons réalisé un suivi de croissance tumorale de cellules B16-OVA implantées en sous-cutané dans le flanc de souris WT recevant un transfert de cellules OTII polarisées en Th1 ou en TFh 5 et 10 jours après implantation tumorale et avons obtenu des résultats similaires (Figure 5b). Cette approche a permis d'établir que les cellules TFh étaient capables d'augmenter substantiellement la survie des souris porteuses de tumeurs (Figure 5c). Nous reproduisons ces observations basées cette fois sur le modèle B16F10 associé à un transfert passif de cellules TFh isolées de souris Trp1 (présentant un TCR dirigé contre un antigène présent dans les tumeurs provenant des souris porteuses de mélanomes) (Figures 5d-f). Pour s'assurer de l'effet spécifique des cellules T injectées et ainsi s'affranchir du biais éventuel induit par le potentiel antitumoral des cellules Trp1 non différenciées, nous prévoyons de répliquer ces expériences avec des cellules T CD4<sup>+</sup> Trp1 différenciées ou non afin de distinguer l'effet propre aux fonctions exercées par les cellules T CD4 polarisées.

Afin de valider la pertinence de notre concept dans un contexte plus proche de la clinique, nous prévoyons de tester notre approche de thérapie cellulaire basée sur le transfert de TFh dans des souris transgéniques sur-exprimant le récepteur 1 du glutamate métabotrope (*Grm1*) dans les mélanocytes. Ces animaux sont caractérisés par une susceptibilité au mélanome. Ce système expérimental permettra donc de confronter l'effet antitumoral des TFh au cours de l'évolution de mélanomes "spontanés" en utilisant un transfert passif de cellules TFh isolées de souris Trp1. Pour tester l'hypothèse selon laquelle les fonctions



**Figure 6.** Caractérisation des TFh dans le sang périphérique de volontaires sains.



**a)** Caractérisation phénotypique par cytométrie en flux des cellules TFh mémoires présentes dans le sang périphérique de volontaires sains après isolement des cellules mononucléées du sang et marquage membranaire dirigé contre les molécules CD4, CXCR5 et PD-1 humaines. **b)** Analyse de cytométrie comparant les profils phénotypiques (CD4, CXCR5, PD-1, IL-21) de cellules TFh différenciées 3 jours *ex vivo* puis restimulés 4 jours en présence d'IL-6 à partir de cellules T CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> ou de TFh initialement triés comme en **a)** puis restimulés *in vitro*. **c)** Des cellules T naïves CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou spécifiquement dirigé contre IRF1 pendant 24h avant d'être différenciées en présence d'anticorps anti-CD3/anti-CD28 et d'IL-6 24h supplémentaires. Ces cellules ont ensuite subi un marquage membranaire contre les molécules CD4, CXCR5 et PD-1 et intracellulaire contre IRF1 avant d'être analysées par cytométrie en flux.

antitumorales des TFh seraient dirigées par IRF1, nous prévoyons de réaliser un transfert adoptif de cellules TFh où IRF1 aura été inactivé de façon stable par shRNA. Les résultats attendus devraient démontrer l'incapacité des TFh à prévenir le développement tumoral en l'absence d'IRF1. Pour comprendre les mécanismes d'action des cellules TFh dans le contrôle de la tumorigenèse, nous emploierons une stratégie de déplétion de différentes populations cellulaires (T CD8, NK, LB) ou de neutralisation de molécules effectrices (IL-21, CXCL13) par injection d'anticorps neutralisants. Nous espérons identifier les mécanismes effecteurs antitumoraux médiés par les cellules TFh grâce à cette série d'expériences *in vivo*.

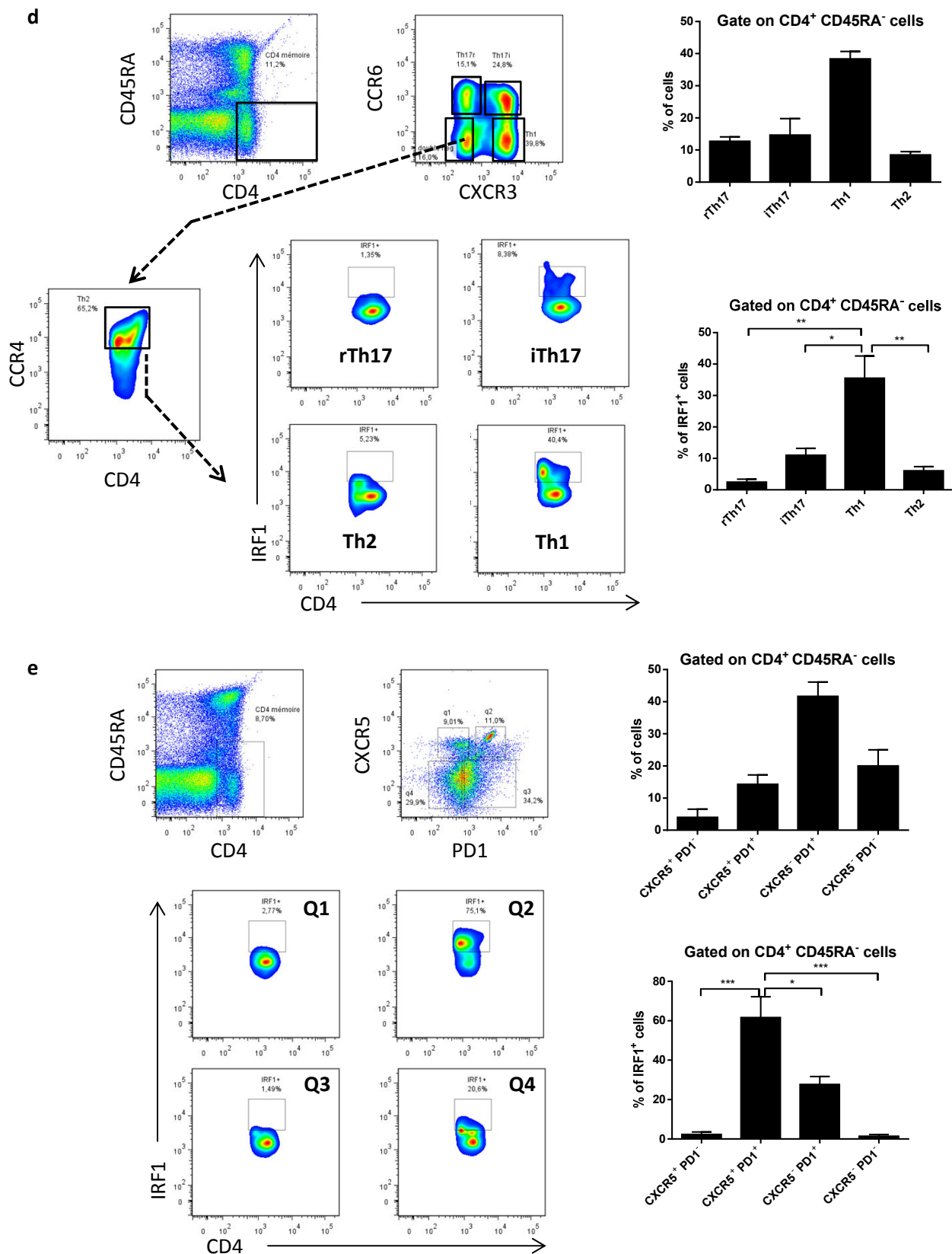
## 6. Caractérisation des TFh chez l'Homme

### 6.1. Caractérisation des TFh dans le sang périphérique de volontaires sains

Le marquage membranaire des cellules mononuclées du sang de volontaires sains a permis d'établir qu'il était possible d'isoler et de caractériser phénotypiquement des cellules T CD45RA<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>, à savoir des cellules TFh mémoires. Cette population environne les 6 à 8 % des cellules T CD4 mémoires circulantes (Figure 6a). Par ailleurs, la mise au point de la différenciation *in vitro* de cellules TFh humaines à partir de cellules naïves CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> souligne que l'apport d'IL-6 exogène semble suffire pour générer des TFh fonctionnels après 3 jours de culture (expression des marqueurs de membrane caractéristiques) puis restimulés 4 jours supplémentaires (production d'IL-21) (Figure 6b). Bien que ces données ne corroborent pas les résultats d'une récente étude sur la polarisation TFh humaine (Schmitt *et al.*, 2014), cette condition de différenciation TFh *ex vivo* est sans équivoque la plus efficace dans nos mains. Des résultats préliminaires suggèrent un rôle crucial d'IRF1 dans l'initiation de la polarisation TFh humaine compte tenu de la plus faible proportion de cellules TFh générées et phénotypiquement caractérisées après extinction d'IRF1 par siRNA (Figure 6c).

### 6.2. Expression d'IRF1 dans les TFh isolés de sang de patientes atteintes de cancer du sein

La caractérisation phénotypique par cytométrie en flux de différentes populations cellulaires T CD4 mémoires (Th1, Th2, Th17 régulateurs ou inflammatoires et TFh) isolées de prélèvements sanguins de patientes atteintes de cancer du sein met en évidence le fait que le facteur de transcription IRF1 est spécifiquement exprimé au sein des cellules TFh et Th1

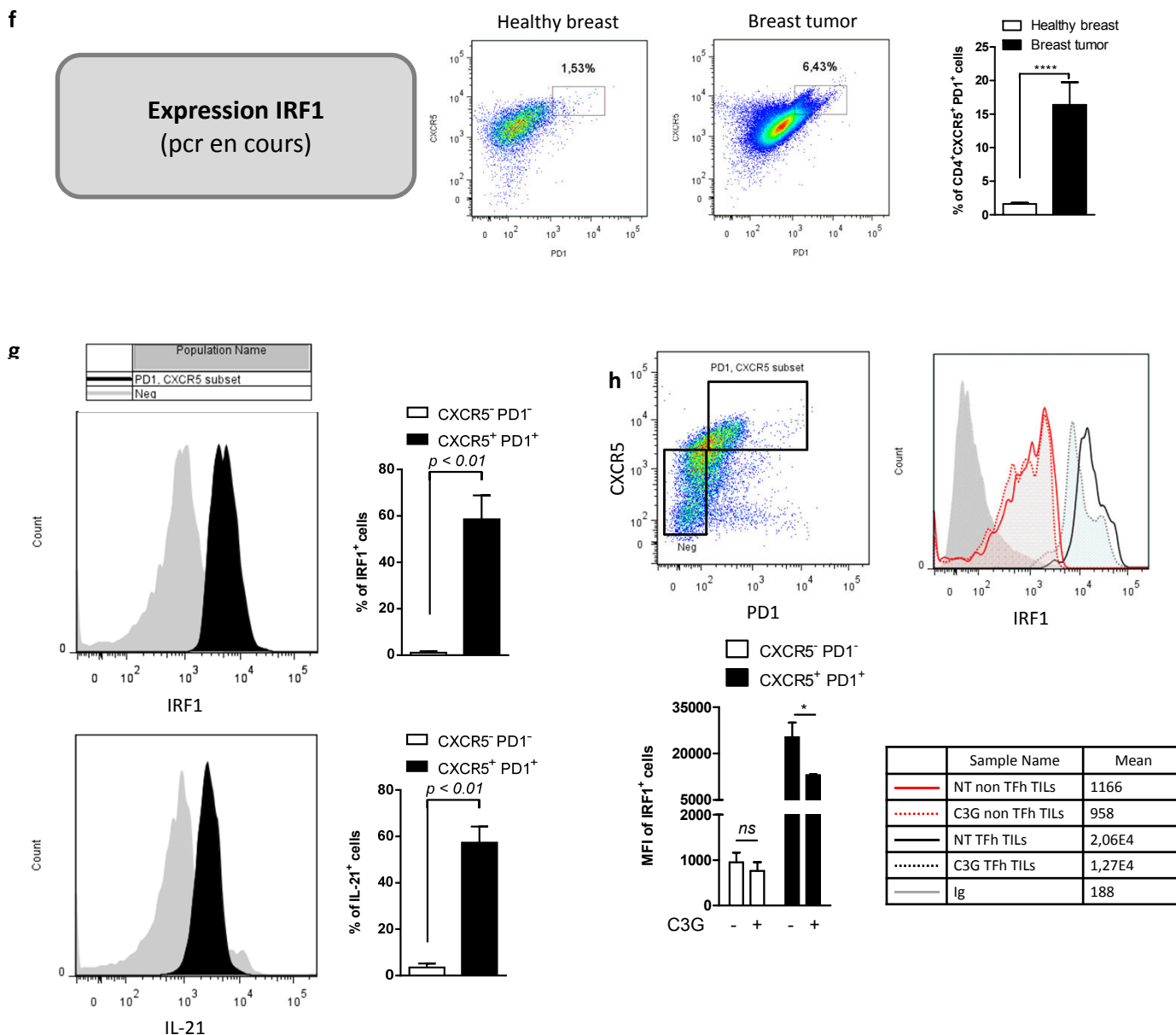


(Figures 6d-e, graphiques bas), populations représentant respectivement en moyenne 15% et 40% des cellules T CD4 mémoires circulantes (Figures 6d-e, graphiques hauts). Ces éléments suggèrent qu'IRF1 semble caractériser et donc contrôler le profil des cellules TFh chez l'Homme, appuyant ainsi la démonstration réalisée dans le modèle murin.

### 6.3. Présence de TFh infiltrant les tumeurs mammaires

L'analyse comparative de la proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> infiltrant le tissu mammaire sain et la tumeur mammaire révèle une infiltration significative des TFh au site tumoral (Figure 6f). En outre, la quantité de TILs de type TFh estimée par cytométrie en flux peut atteindre jusqu'à 25% des cellules T CD4<sup>+</sup> retrouvées dans le prélèvement tumoral, augmentant ainsi sensiblement la quantité de TFh retrouvée au site tumoral par rapport au nombre moyen de lymphocytes TFh relevé dans le compartiment sanguin. Ces résultats semblent indiquer la localisation préférentielle des TFh au niveau de la tumeur chez des patientes atteintes d'un cancer du sein. Par ailleurs, les TFh infiltrant la tumeur expriment IRF1 et sécrètent l'IL-21, ce qui laisse supposer que ces lymphocytes sont fonctionnels au sein de la tumeur (Figure 6g, panels haut et bas). Enfin, les TILs incubés 12 heures en présence d'un inhibiteur pharmacologique d'IRF1 (C3G pour cyanidine 3-glucoside) et d'anticorps anti-CD3/anti-CD28 montrent une MFI significativement réduite par rapport aux TILs restimulés mais non traités par C3G (Figure 6h, panels haut et bas).

**Figure 6.** Présence de TFh infiltrant les tumeurs mammaires.



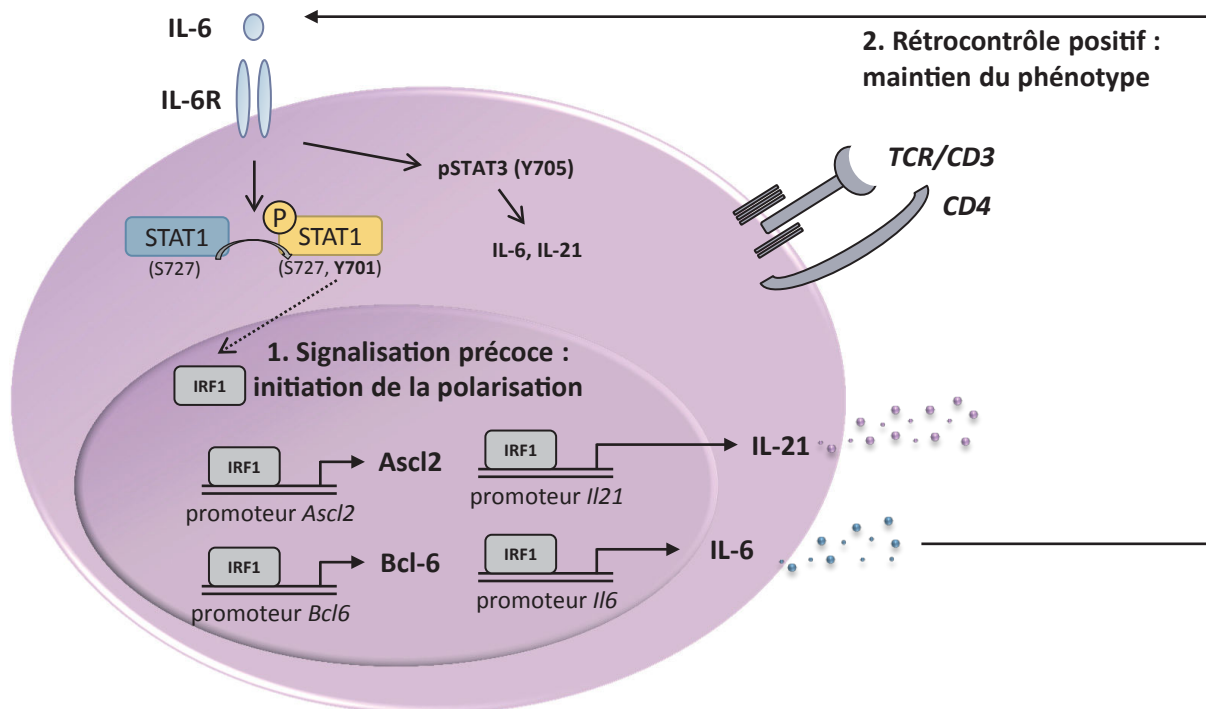
**f-g)** Des lymphocytes T ont été extraits de pièces de réduction mammaire (n=6) ou de biopsies tumorales mammaires (n=10). **f)** Caractérisation phénotypique par cytométrie en flux des cellules TFh présentes dans les tissus basée sur la co-expression des marqueurs CD4, CXCR5 et PD-1. **e)** Analyse comparative par cytométrie en flux de l'expression d'IL-21 et d'IRF1 parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs de nature TFh ou non (n=5 par groupe). **h)** Les TILs isolés ont été restimulés une nuit en présence d'anticorps anti-CD3/anti-CD28 et traités ou non par un inhibiteur pharmacologique d'IRF1 (C3G, 100 μM) puis les effets sur l'expression d'IRF1 a été évaluée après marquage intracellulaire et analyse par cytométrie en flux. Ces résultats sont représentatifs d'une expérience présentant deux échantillons indépendants par groupe.

## 7. Conclusion

Les cellules T folliculaires helper (TFh) constituent un sous-type lymphocytaire T CD4 nouvellement décrit suscitant un intérêt grandissant au sein de la communauté scientifique. En effet, les connaissances relatives aux mécanismes de régulation de la différenciation TFh restent incomplètement fondées. Si ces cellules sont déjà connues pour coopérer avec les lymphocytes B mémoires au niveau des organes lymphoïdes secondaires, la compréhension des mécanismes qui sous-tendent leur différenciation est moins claire. C'est très précisément dans cet axe que s'inscrit notre travail de recherche. Nos données *in vitro* suggèrent le rôle central du facteur de transcription *Interferon Regulatory Factor 1* (IRF1) dans la régulation de la différenciation des cellules TFh. Par ailleurs, l'implication pronostique des TFh dans un contexte de pathologie cancéreuse demeure peu documentée bien que leur présence au site tumoral ait été corrélée à une meilleure survie des patients.

Ce projet de recherche contribuera à une meilleure compréhension de la biologie du lymphocyte T folliculaire auxiliaire. Nous cherchons à décrypter les événements moléculaires responsables de l'activation d'IRF1 initiant la polarisation TFh et à établir le fait que leurs fonctions effectrices potentiellement antitumorales soient directement placées sous le contrôle transcriptionnel d'IRF1. Les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent qu'IRF1 est précocement induit au cours de la polarisation TFh et que cette induction est dépendante de l'activation de STAT1 elle-même déclenchée après stimulation de l'IL-6R. Nous montrons également qu'IRF1 est crucial pour la génération de lymphocytes TFh *in vitro* et *in vivo*. Par la suite, nous espérons que la comparaison des profils de gènes spécifiques aux cellules TFh qu'elles soient générées *in vitro* ou induites *in vivo* permettra de révéler un profil d'expression similaire. Ceci validera le rôle d'IRF1 dans le profil TFh *in vivo*. Nous montrons également que suite à l'induction précoce d'IRF1 dans les cellules TFh, l'activité transcriptionnelle de ce facteur s'applique à la transactivation des promoteurs des gènes *Ascl2*, *Bcl6*, *Il6* et *Il21*, suggérant ainsi qu'il contrôle l'engagement du programme TFh. La suite de ce travail a principalement consisté en l'étude de la réponse T folliculaire *in vivo* dans un contexte tumoral. Pour déterminer le rôle des TFh sur la progression tumorale, nous avons réalisé des expériences de transfert adoptif de cellules TFh dans des modèles de cancers spécifiques de l'antigène (B16-OVA, antigène de mélanome Trp1). Nous nous attacherons ensuite à valider la pertinence de notre concept dans un modèle plus proche de la clinique *via* le transfert adoptif de cellules TFh dans des souris transgéniques *Grm1*

développant des mélanomes "spontanés". Enfin, l'injection d'anticorps neutralisants (blocage de l'IL-21, de CXCL13, des cellules NK, T CD8 et B) devrait permettre d'identifier le(s) mécanisme(s) d'action des cellules TFh dans un contexte tumoral. Ainsi, cette démarche nous permettra de démontrer le fait qu'IRF1 contrôle les fonctions effectrices des cellules TFh et appuiera leur utilisation potentielle en immunothérapie anticancéreuse. Dans ce cadre, nous avons débuté la caractérisation des cellules TFh chez l'Homme. L'examen de biopsies tumorales de patientes atteintes de cancer du sein révèle que les cellules TFh infiltrent la tumeur et y sont fonctionnelles (marqueurs de membrane spécifiques et sécrétion d'IL-21). L'analyse comparative de prélèvements réalisés chez ces patientes montre la localisation préférentielle des TFh dans le microenvironnement tumoral par rapport au tissu sain (pièce de réduction mammaire) ou au compartiment sanguin. Enfin, les essais actuellement en cours suggèrent que les fonctions effectrices des TFh dépendent d'IRF1 en contrôlant notamment la production d'IL-21. La preuve de ce mécanisme reste néanmoins à établir ; le recours aux modèles expérimentaux à notre disposition nous permettra de valider nos hypothèses dans un contexte tumoral.



### Cellule TFh en cours de différenciation

**Figure 18.** Activité transcriptionnelle d'IRF1 sur le programme des cellules TFh.

## **DISCUSSION**



La théorie de l'immunosurveillance tumorale énonce que les réponses immunitaires contribuent à limiter le développement des cellules tumorales. Cette hypothèse qui a été vérifiée chez la souris et chez l'Homme est à la base de nombreuses stratégies d'immunothérapies. Notre travail de recherche consiste à comprendre les bases moléculaires de la différenciation cellulaire T CD4 afin de renforcer leurs propriétés anticancéreuses ou au contraire d'optimiser la réponse antitumorale en limitant l'implication délétère de certaines entités cellulaires ou moléculaires.

## **I. Impact du DHA sur le développement des cellules Th17 dans un contexte tumoral ou comment restaurer une réponse anticancéreuse efficace au moyen d'une molécule anti-inflammatoire**

L'inflammation joue un rôle ambivalent au cours de la progression tumorale. Elle peut être bénéfique à l'hôte et favoriser la régression tumorale en stimulant une réponse immunitaire adaptative *via* l'induction de la polarisation des lymphocytes T CD8 en lymphocytes cytotoxiques de type 1. A l'inverse, ces signaux peuvent également induire une modification de la réponse immunitaire innée impliquée dans des phénomènes protumoraux en stimulant l'angiogenèse tumorale et la génération des lymphocytes T régulateurs ou de cellules Th17 (Mantovani *et al.*, 2008). Les cellules Th17 sont une population de lymphocytes T CD4 caractérisée par leur capacité à produire des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et le TNF- $\alpha$  et expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Elles sont générées *in vitro* chez la souris par stimulation des lymphocytes T CD4 naïfs avec du TGF- $\beta$  et de l'IL-6. Bien que ROR $\gamma$ t soit indispensable à l'induction des Th17, la phosphorylation de STAT3 est également essentielle à leur différenciation et semble être un phénomène initiateur dans l'induction de leur polarisation (Harris *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007).

L'acide docosahexaénoïque (DHA), acide gras polyinsaturé de la série n-3 présent dans les poissons gras, était déjà connu pour ses propriétés anti-inflammatoires (Bang *et al.*, 1971; Bang *et al.*, 1980). L'administration de DHA à des patients atteints de cancer a ensuite montré une réduction dans leur production de médiateurs pro-inflammatoires (Finocchiaro *et al.*, 2012). Les effets de cette molécule sur les cellules myéloïdes ont été bien décrits mais son influence sur les lymphocytes T CD4 restait peu documenté. Compte tenu du fait que l'IL-17

puisse contribuer à la progression tumorale en favorisant la néoangiogenèse (Wang *et al.*, 2009), nous avons cherché à déterminer l'impact de cette molécule anti-inflammatoire sur le développement des cellules Th17.

Si l'activation de PPAR $\gamma$  a été associée à la réduction des phénomènes inflammatoires, la série d'événements intracellulaires conduisant à son induction ainsi que son implication dans la résolution de l'inflammation restaient débattus (Shibata *et al.*, 2008; Yki-Jarvinen, 2004). Nos travaux montrent que le DHA active PPAR $\gamma$  et induit en conséquence l'expression de SOCS3. SOCS3 agit alors comme un répresseur intrinsèque de la différenciation Th17 en interférant avec la voie de signalisation STAT3, ce qui aboutit à la diminution de l'expression de *Rorc* et à plus faible sécrétion d'IL-17 par ces cellules. De plus, le DHA prévient la progression tumorale *in vivo* en limitant la production d'IL-17 par les cellules T CD4. Ces travaux apportent donc des éléments de réponses quant aux mécanismes responsables des propriétés anti-inflammatoires et antitumorales du DHA.

Démonstration faite de ce mécanisme chez la souris, l'activité du DHA s'est révélée pertinente chez l'Homme. Dans le manuscrit, nous avons discuté de l'inflammation chronique comme condition pré-requise à la transformation cellulaire et favorisant la formation d'une tumeur. L'évaluation des effets d'un apport alimentaire en DHA a montré sa capacité à atténuer la sévérité des désordres inflammatoires dans le modèle de colite expérimentale ainsi que chez des patients souffrant de maladie inflammatoire chronique intestinale (Almallah *et al.*, 2000; Belluzzi *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2001). Alors, le lien entre inflammation et cancer étant largement établi, ceci expliquerait comment les AGPI n-3, au travers de leurs propriétés anti-inflammatoires, sont associés à une plus faible incidence de cancer (Fradet *et al.*, 2009; Thiebaut *et al.*, 2009). Par ailleurs, deux études cliniques ont montré qu'une supplémentation alimentaire en AGPI n-3 au cours de la chimiothérapie améliorait l'efficacité de ce traitement chez des patients atteints de cancers du sein (Bougnoux *et al.*, 2009) et du poumon (Murphy *et al.*, 2011). Au-delà de la sensibilisation des tumeurs à la chimiothérapie, nous suggérons plus largement que l'administration de DHA comme complément alimentaire serait susceptible d'apporter des bénéfices significatifs dans le cadre de pathologies où la sécrétion d'IL-17 est indésirable (cancers, troubles auto-immuns). En effet, l'IL-17 est un facteur pro-angiogénique capable d'activer la voie de signalisation du VEGF dans les cellules tumorales et/ou endothéliales stromales (Numasaki *et al.*, 2003). Or, le potentiel

anti-angiogénique du DHA permet également d'expliquer son action antitumorale et compte parmi les processus de sensibilisation des tumeurs aux AGPI n-3. D'un point de vue mécanistique, les AGPI n-3 inhibent la voie de signalisation VEGF/VEGFR-2/AKT/NO sur les cellules endothéliales (Sterescu *et al.*, 2006; Tsuji *et al.*, 2003). Des études *in vitro* ont montré que les AGPI n-3 bloquaient la migration et la formation de pseudocapillaires par des cellules endothéliales humaines (Tsuzuki *et al.*, 2007); cette inhibition étant associée à une diminution *in vitro* des niveaux d'expression de métalloprotéases matricielles, enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire et nécessaires à néovascularisation. D'autres études ont rapporté un effet apoptotique du DHA sur les cellules endothéliales en prolifération (Kim *et al.*, 2005), une régression tumorale induite par le DHA *via* la réduction significative de la surface vasculaire (Mukutmoni-Norris *et al.*, 2000) ou encore relative à une diminution de la vascularisation avant et pendant la chimiothérapie (Colas *et al.*, 2006). Si nos résultats soutiennent l'idée qu'une supplémentation alimentaire en DHA puisse exercer des propriétés anti-angiogéniques, le DHA pourrait être envisagé en tant que possible molécule anti-angiogénique candidate à de futurs essais cliniques.

## **II. Potentialisation des fonctions antitumorales des cellules Th9 par l'IL-1 $\beta$ ou comment renforcer les défenses anticancéreuses**

Le microenvironnement de la tumeur est caractérisé par la présence au site tumoral de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 $\beta$ . Le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans la polarisation T CD4 est connu, cette cytokine permet d'amplifier la polarisation Th17 et Th9 (Martin-Orozco *et al.*, 2009; Uyttenhove *et al.*, 2010). Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'induction de la polarisation Th17 est décrit mais l'influence de l'IL-1 $\beta$  sur le programme transcriptionnel Th9 restait inexploré et a constitué la seconde partie de ce travail. Les cellules Th9 ont été initialement caractérisées comme sous-type T CD4 n'exprimant pas Foxp3 et produisant de grandes quantités d'IL-9 (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008). En plus du TGF- $\beta$ , les cellules Th9 demandent la signalisation par l'IL-4, la cytokine canonique du profil Th2. Les Th9 peuvent d'ailleurs résulter de la reprogrammation de cellules Th2 sous la stimulation du TGF- $\beta$ , ce qui appuie la proximité et l'interdépendance entre ces sous-types lymphocytaires. En effet, l'induction du facteur de transcription IRF4 est requise pour générer ces deux sous-ensembles cellulaires (Rengarajan *et al.*, 2002; Staudt *et al.*, 2010).

Ce travail met en évidence l'activation d'IRF1 dans les cellules Th9 induites en présence d'IL-1 $\beta$ . L'activité transcriptionnelle d'IRF1 amplifie la production d'IL-9 et d'IL-21 par les cellules Th9 alors dotées de puissantes propriétés anticancéreuses. L'IL-21 sécrétée par ces cellules induit la libération d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et T CD8 et explique le mécanisme d'action antitumorale des cellules Th9 *in vivo*. Les propriétés anticancéreuses des lymphocytes Th9 reposent finalement sur l'expression d'IRF1, soulignant le rôle crucial de ce facteur de transcription dans les effets antitumoraux médiés par ces cellules. Par ailleurs, l'intervention d'IRF1 dans le programme transcriptionnel Th9 stabilise le phénotype de ces cellules et n'autorise pas leur conversion en un autre sous-type lymphocytaire (Th1 ou Th17). Dans l'ensemble, ces données confortent l'idée déjà conceptualisée que les cellules Th9 correspondent à un sous-type lymphocytaire T CD4 distinct.

Enfin, l'IL-21 libérée par les cellules T CD4 stimule la production d'IFN- $\gamma$  et amplifie les fonctions cytotoxiques des cellules NK et T CD8 en agissant de concert avec les signaux médiés par l'IL-2 et l'IL-15. L'IL-21 est en effet capable de renforcer la prolifération des cellules T CD8 murines et de promouvoir l'expansion clonale de leurs homologues chez l'Homme (Zeng *et al.*, 2005). Nos observations relatives aux fonctions antitumorales des cellules Th9 différenciées en présence d'IL-1 $\beta$  et dépendantes de l'IL-21 *in vivo* sont donc conformes aux données de la littérature. Chez l'homme, l'innocuité et l'efficacité de l'IL-21 ont été évaluées dans une étude multicentrique de phase II chez des patients atteints de mélanome métastatique. L'utilisation de l'IL-21 comme traitement de première ligne des mélanomes métastatiques a révélé un taux de réponse global de 22,5%, suggérant l'efficacité de cette molécule à prévenir la progression cancéreuse (Petrella *et al.*, 2012). Dans ce contexte, nous avons montré qu'au-delà de leur production d'IL-9, les cellules Th9 induites en présence d'IL-1 $\beta$  sécrétaient également de grandes quantités d'IL-21. Ces observations permettent de proposer ces cellules en tant que thérapeutique potentiellement candidate à une évaluation clinique. Puisque les cellules T fonctionnelles peuvent infiltrer le lit tumoral et déverser des quantités conséquentes de cytokines dans le microenvironnement direct de la tumeur, le recours à la thérapie cellulaire associée à l'administration de cytokines recombinantes offre des perspectives thérapeutiques séduisantes.

### III. Activité transcriptionnelle d'IRF1 sur le profil TFh : de l'approche moléculaire aux enjeux de thérapie cellulaire

Le second projet a mis en exergue la question de la régulation transcriptionnelle de la différenciation des cellules T CD4 par les facteurs de réponse aux interférons (IRF). Les interférons constituent une famille de cytokines biologiquement importantes par leurs propriétés antiprolifératives, antivirales et antitumorales (Miyamoto *et al.*, 1988). En effet, leur sécrétion promeut les différentes lignes de défenses immunitaires lors de pathologies tumorales. Ces connaissances soulignent le fait que les facteurs de réponse aux interférons jouent un rôle suppresseur de tumeur. D'autres travaux ont mis l'accent sur le rôle d'IRF1 dans la régulation des réponses immunes adaptatives (Honda and Taniguchi, 2006; Taniguchi *et al.*, 2001). Le facteur de transcription IRF1 a été initialement décrit comme spécifique aux cellules Th1 fonctionnelles (Kano *et al.*, 2008). L'étude présentant la potentialisation du profil Th9 par l'IL-1 $\beta$  a mis en évidence le rôle crucial d'IRF1 dans le contrôle des fonctions effectrices de ces cellules et pose la question éventuelle de l'implication d'IRF1 dans la régulation d'autres programmes cellulaires T CD4.

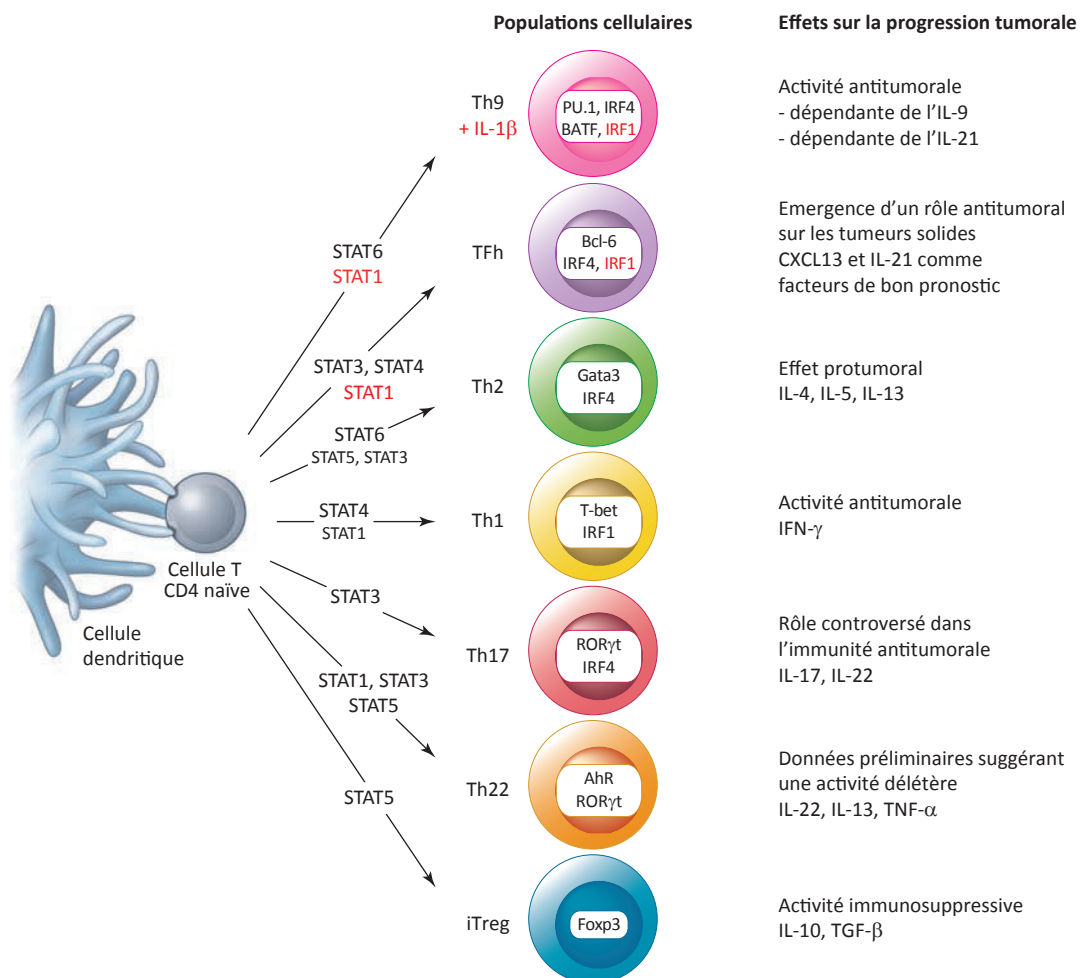
Nos données sur l'activité transcriptionnelle d'IRF1 dans la polarisation TFh trouve un appui indirect dans la littérature. En effet, une étude récente montre l'implication de la molécule ICOS dans le maintien du phénotype TFh. ICOS fait intervenir le facteur de transcription Klf2 (*Krüppel-like factor 2*) via Foxo1 (*Forkhead box O1*). Klf2 se lie aux promoteurs de *Cxcr5* et *Ccr7* notamment et ce indépendamment des événements précoces contrôlant l'expression de *Bcl6* et *d'Acs12* (Weber *et al.*, 2015). L'interaction de Klf2 sur ces régions promotrices soutient l'expression de ces gènes responsables du motif d'adressage des lymphocytes TFh au niveau des centres germinatifs. Cette étude discrimine donc les événements précoces de signalisation dépendants de la stimulation de CD28, de l'action régulatrice de la molécule de costimulation ICOS sur Klf2. Nous montrons qu'IRF1 contrôle l'étape d'engagement de la différenciation TFh et ne semble pas intervenir dans la régulation de CXCR5 ou de c-Maf, mais bien de Bcl-6 et d'Ascl2 ce qui est pertinent avec les observations relevées dans cette étude. Toutefois, l'induction d'IRF1 dans les cellules TFh en cours de différenciation est dépendante de l'activation de STAT1 elle-même tributaire de la stimulation par l'IL-6. Nous montrons donc que les événements précoces de signalisation conduisant à l'expression d'IRF1, qui contrôle le programme transcriptionnel TFh, ne dépendent pas de l'engagement du TCR (CD3 et

costimulation par CD28) mais surviennent directement en réponse à la signalisation médiée par l'IL-6 orientant spécifiquement la polarisation de ces cellules.

Bien que les stratégies de thérapie cellulaire aient longtemps compté sur le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 (Dudley *et al.*, 2002), des études précliniques ont d'ores et déjà mis en lumière le potentiel des cellules T CD4 à contribuer au rejet de la tumeur (Muranski and Restifo, 2009). Preuve de principe de ce concept, le transfert autologue de cellules T CD4 spécifiques de l'antigène tumoral NY-ESO-1 a été utilisé dans le traitement du mélanome métastatique chez l'Homme (Hunder *et al.*, 2008). Cette approche s'est avérée sûre et ne nécessite pas de conditionnement préalable ou un traitement par cytokines, ce qui indique que le transfert adoptif de lymphocytes T CD4 peut être appliqué à une situation clinique. Bien que spécifiquement dirigé contre l'antigène NY-ESO-1, les cellules infusées aux patients sont capables de stimuler les réponses endogènes contre d'autres antigènes tumoraux. L'efficacité du transfert de cellules T CD4 à l'encontre des antigènes exposés par la tumeur repose donc sur les réponses immunitaires du patient. Dans ce contexte, nous nous attacherons à valider l'hypothèse selon laquelle les cellules TFh, grâce à leur sécrétion d'IL-21 au site tumoral, sont capables de mobiliser les populations cytotoxiques T CD8 et NK. L'étude ultérieure de l'efficacité anticancéreuse de ces cellules chez les patients atteints de cancer semblerait alors pertinente et permettrait de conforter l'idée émergente d'un rôle antitumoral joué par ces cellules chez l'Homme.

#### **IV. Les facteurs de transcription des familles des STAT et des IRF et l'IL-21 au cœur des mécanismes de régulation impliqués dans le contrôle de la différenciation des sous-types cellulaires Th17, Th9-IL-1 $\beta$ et TFh**

Suite à la stimulation antigénique, les cellules T CD4 ont le potentiel de se différencier en un large éventail de sous-types cellulaires spécialisés effecteurs. A ce jour, de nombreux progrès ont été accomplis quant à l'identification des mécanismes moléculaires de base qui régissent les étapes initiales décisionnaires de l'engagement dans ces diverses voies de polarisation T CD4. Les recherches émergentes pointent de plus en plus la complexité émanant de la série d'événements qui dirigent ces étapes d'engagement des cellules T helper, insuffisamment appréciée par le passé. Lors du processus d'engagement, les cellules T auxiliaires doivent



**Figure 19. Représentation schématique de l'implication des STAT et IRF dans le contrôle de la différenciation lymphocytaire T CD4.**

Les protéines STAT sont bien connues pour leur rôle dans la transmission des signaux médiés par les cytokines et leur implication dans la spécification des voies de différenciation cellulaire T CD4. Ces protéines jouent des rôles variés et complexes dans la régulation de gènes et le contrôle épigénétique et sont aussi décrites pour être des répresseurs fonctionnels. Les STAT sont donc en partie responsable du devenir de la cellule T CD4 suite à la perception de la signalisation induite par les cytokines. L'engagement vers une spécialisation effectrice est fonction de la spécificité ou au contraire de la redondance des voies de transduction du signal en aval. D'après (O'Shea and Paul, 2010).

intégrer les signaux provenant à la fois du TCR et de leur environnement. Ces signaux externes sont ensuite retraduits en modifications internes capables de moduler l'expression génique pour déterminer en définitive les caractéristiques fonctionnelles de la cellule.

Les STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) sont des protéines impliquées dans la régulation du processus de différenciation cellulaire en ce sens qu'elles perçoivent les signaux transmis après stimulation des récepteurs par les facteurs extérieurs (Figure 19, p. 178) (Knosp and Johnston, 2012). Chez les mammifères, la famille des STAT compte sept membres : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. Leur identification initiale repose en grande partie sur des travaux portant sur les voies de signalisation sensibles aux cytokines. Il s'agit de facteurs de transcription pourvus d'un domaine SH2 par lequel ils s'ancrent aux séquences contenant une phosphotyrosine. Dans les cellules non stimulées, les STAT résident à l'état inerte dans le cytoplasme. La stimulation des récepteurs de cytokine enclenche le recrutement de protéines adaptatrices et entraîne la fixation des protéines STAT *via* leur domaine SH2 à des séquences à phosphotyrosine du domaine peptidique cytoplasmique du récepteur. Une fois associées aux récepteurs activés, les STAT vont être phosphorylées par des protéine-tyrosine kinases non réceptrices de la famille des JAK (*Janus kinases*) associées aux récepteurs (O'Shea and Plenge, 2012). Consécutivement à la phosphorylation de leurs tyrosines, les protéines STAT se dimérisent et gagnent le noyau où elles activent la transcription de leurs gènes cibles. Les facteurs de transcription STAT permettent donc de soumettre directement dans le noyau la régulation de l'expression des gènes aux récepteurs de cytokines occupant la surface cellulaire. Par exemple, en réponse à la liaison de l'IFN sur son récepteur spécifique, les STAT activés vont induire la transcription de gènes possédant sur leur région promotrice au moins un élément enhancer appelé *IFN-stimulated response element* (ISRE) pour les IFN de type 1 et *IFN-gamma activating sequence* (GAS) pour les IFN de type 2. Les IFN de type 1 (IFN- $\alpha/\beta$ ) activent sélectivement STAT1 et STAT2 qui s'associent à l'un des membres de la famille des *Interferon Regulatory Factors* (IRF), IRF9, pour se fixer sur les séquences ISRE. L'IFN de type 2 (IFN- $\gamma$ ), quant à lui, active uniquement STAT1 qui, sous la forme d'un homodimère, interagit avec les séquences GAS. Parmi les gènes activés par l'IFN, les facteurs de transcription de la famille des IRF vont amplifier la réponse en induisant une réponse secondaire. Il est à noter que certains gènes stimulés par l'IFN ne répondent qu'à un seul type d'IFN alors que d'autres sont activés par les deux types en fonction de leur structure promotrice.



Au regard des travaux présentés, l'implication de la signalisation médiée par l'IL-21 apparaît centrale dans la différenciation des sous-populations Th17, Th9-IL-1 $\beta$  et TFh. L'IL-21 est une cytokine possédant de vastes actions pléiotropiques qui affectent la différenciation et la fonction des cellules lymphoïdes et myéloïdes. Depuis sa découverte en 2000 (Parrish-Novak *et al.*, 2000), de multiples éléments ont aidé à la compréhension des actions biologiques et des mécanismes moléculaires contrôlant les réponses cellulaires médiées par l'IL-21. Cette cytokine, qui régule à la fois les réponses immunitaires innées et adaptatives, est principalement produite par les cellules NKT, les cellules TFh et Th17. Son récepteur est retrouvé sur de nombreux types cellulaires de l'immunité, mais son expression majeure est observée dans les lymphocytes B. Il est présent à l'état basal sur les cellules B matures folliculaires et son expression peut encore être amplifiée après stimulation de leur BCR ou de CD40. Après stimulation de son récepteur composé d'une chaîne  $\alpha$  spécifique (IL-21Ra) associée à la chaîne commune  $\gamma_c$  (Asao *et al.*, 2001), l'IL-21 initie une cascade de signalisation via les voies JAK/STAT, MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) et PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*)/AKT (Spolski and Leonard, 2014). Comme les autres cytokines de la famille de l'IL-2, l'IL-21 active JAK1 et JAK3. Dans les cellules T, elle active puissamment et de façon plus prolongée STAT3 qu'elle n'active STAT1 ou STAT5a/b. Des travaux portant sur la régulation de Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) ont montré qu'un élément de réponse à l'IL-21 était composé de deux parties liant à la fois IRF4 et STAT3 (Kwon *et al.*, 2009). Des analyses basées sur des approches de CHIP-seq ont par la suite révélé que de tels éléments bipartites étaient retrouvés sur l'ensemble du génome et globalement impliqués dans la régulation de nombreux gènes induits par l'IL-21. Concernant ses effets sur les sous-types effecteurs T CD4, l'IL-21 est souvent responsable de l'amplification des programmes d'expression génique consécutivement aux boucles de rétrocontrôle qui s'instaurent durant le processus de polarisation T auxiliaire, et ce dans le but de stabiliser les phénotypes de ces cellules (Yamane and Paul, 2012). Dans les cellules TFh, l'IL-21 active de façon prédominante STAT3 mais également STAT1 dans une certaine mesure qui promeut alors l'induction des gènes associés au profil TFh (Bcl-6, c-Maf) (Spolski and Leonard, 2010, 2014). L'IL-21 sécrétée par les cellules Th17 agit de façon autocrine pour renforcer l'expression de l'IL-23R amplifiant ainsi leur sensibilité à l'IL-23, cette dernière est alors responsable de la stabilisation et de l'expansion de cette population cellulaire (Korn *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). En outre, l'IL-21 induit l'expression des facteurs de transcription ROR $\alpha$  et ROR $\gamma$ t après activation de STAT3.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

En raison des mécanismes de résistance développés par les cellules tumorales, les chimiothérapies anticancéreuses démontrent une action transitoire et sont incapables d'induire une guérison durable dans la plupart des cancers solides de stade avancé. De tels échappements aux thérapies anticancéreuses classiques nécessitent donc une approche plus ciblée dans le but de stimuler la réponse antitumorale et de garantir *in fine* une rémission totale. Nos travaux visent à optimiser les réponses T CD4 effectrices dans la lutte antitumorale et à définir les cibles moléculaires potentielles d'immunomodulation dans un souci d'amélioration des stratégies/solutions thérapeutiques. En effet, si l'élucidation des événements moléculaires engagés dans la signalisation permet d'approfondir nos connaissances conceptuelles dans le domaine de la différenciation T CD4, elle procure également des informations exploitables en recherche translationnelle pour générer des applications cliniques à visée thérapeutique.

Ces résultats suggèrent que la modulation de l'activité des lymphocytes T CD4 est pertinente dans un contexte tumoral et pourrait aboutir à des solutions thérapeutiques. De plus, nos travaux montrent qu'il est possible de moduler l'activité de cellules *in vitro* afin de les utiliser en thérapie cellulaire. Enfin, ils ouvrent des perspectives et des questions quant aux rôles d'IRF1 dans la différenciation des cellules T CD4. Nos travaux sous-tendent le rationnel du développement de nouveaux protocoles combinant à la fois traitements antinéoplasiques et immunothérapie ciblée. Le recours à l'immunothérapie visant la réactivation ou la reprogrammation de lymphocytes T CD4 associée à des traitements ciblant de mieux en mieux le type de cellules tumorales incriminées permettra alors de contourner ces mécanismes de résistance. Ainsi, une connaissance approfondie du réseau moléculaire responsable des événements de signalisation sont nécessairement préalables à la mise au point des solutions thérapeutiques capables de préserver, de potentialiser ou encore de restaurer les réponses immunes antitumorales.

Dans cette optique d'amélioration des protocoles thérapeutiques en immuno-cancérologie, la stratégie du laboratoire est de définir les fondements mécanistiques dans les modèles animaux puis d'appréhender ces concepts chez l'Homme. Finalement, le but est de proposer des outils capables d'optimiser la réponse immunitaire antitumorale pour limiter le développement de cancer et/ou de métastases. Les progrès à réaliser dans ce domaine sont essentiels et constituent un enjeu crucial de la recherche actuelle.

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Addadi, Y., Moskovits, N., Granot, D., Lozano, G., Carmi, Y., Apte, R.N., Neeman, M., and Oren, M. (2010). p53 status in stromal fibroblasts modulates tumor growth in an SDF1-dependent manner. *Cancer Res* 70, 9650-9658.

Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* 3, 549-557.

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature reviews Cancer* 7, 834-846.

Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537-1544.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.

Alexandroff, A.B., Nicholson, S., Patel, P.M., and Jackson, A.M. (2010). Recent advances in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in bladder cancer. *Immunotherapy* 2, 551-560.

Algarra, I., Collado, A., and Garrido, F. (1997). Altered MHC class I antigens in tumors. *International journal of clinical & laboratory research* 27, 95-102.

Almallah, Y.Z., Ewen, S.W., El-Tahir, A., Mowat, N.A., Brunt, P.W., Sinclair, T.S., Heys, S.D., and Eremin, O. (2000). Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect in situ. *Journal of clinical immunology* 20, 68-76.

Altieri, D.C. (2010). Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *The Biochemical journal* 430, 199-205.

Apetoh, L., Quintana, F.J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E.J., Sherr, D.H., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2010). The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol* 11, 854-861.

Aruga, A., Aruga, E., Tanigawa, K., Bishop, D.K., Sondak, V.K., and Chang, A.E. (1997). Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. *J Immunol* 159, 664-673.

Asao, H., Okuyama, C., Kumaki, S., Ishii, N., Tsuchiya, S., Foster, D., and Sugamura, K. (2001). Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 167, 1-5.

Ashour, H.M., and Niederkorn, J.Y. (2006). Gammadelta T cells promote anterior chamber-associated immune deviation and immune privilege through their production of IL-10. *J Immunol* 177, 8331-8337.

Aspord, C., Pedroza-Gonzalez, A., Gallegos, M., Tindle, S., Burton, E.C., Su, D., Marches, F., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med* 204, 1037-1047.

Attakpa, E., Hichami, A., Simonin, A.M., Sanson, E.G., Dramane, K.L., and Khan, N.A. (2009). Docosahexaenoic acid modulates the expression of T-bet and GATA-3 transcription factors, independently of PPARalpha, through suppression of MAP kinase activation. *Biochimie* 91, 1359-1365.

Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., *et al.* (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14, 275-281.

Azuma, T., Yao, S., Zhu, G., Flies, A.S., Flies, S.J., and Chen, L. (2008). B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 111, 3635-3643.

Badoual, C., Hans, S., Merillon, N., Van Ryswick, C., Ravel, P., Benhamouda, N., Levionnois, E., Nizard, M., Si-Mohamed, A., Besnier, N., *et al.* (2013). PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* 73, 128-138.

Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-1253.

Baginska, J., Viry, E., Berchem, G., Poli, A., Noman, M.Z., van Moer, K., Medves, S., Zimmer, J., Oudin, A., Niclou, S.P., *et al.* (2013). Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 17450-17455.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Bang, H.O., Dyerberg, J., and Nielsen, A.B. (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet* 1, 1143-1145.

Bang, H.O., Dyerberg, J., and Sinclair, H.M. (1980). The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *The American journal of clinical nutrition* 33, 2657-2661.

Belardelli, F., and Ferrantini, M. (2002). Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends in immunology* 23, 201-208.

Belluzzi, A., Boschi, S., Brignola, C., Munarini, A., Cariani, G., and Miglio, F. (2000). Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *The American journal of clinical nutrition* 71, 339S-342S.

Benchetrit, F., Ciree, A., Vives, V., Warnier, G., Gey, A., Sautes-Fridman, C., Fossiez, F., Haicheur, N., Fridman, W.H., and Tartour, E. (2002). Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99, 2114-2121.

Berger, H., Vegran, F., Chikh, M., Gilardi, F., Ladoire, S., Bugaut, H., Mignot, G., Chalmin, F., Bruchard, M., Derangere, V., *et al.* (2013). SOCS3 transactivation by PPARgamma prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer Res* 73, 3578-3590.

Bhagat, G., Naiyer, A.J., Shah, J.G., Harper, J., Jabri, B., Wang, T.C., Green, P.H., and Manavalan, J.S. (2008). Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest* 118, 281-293.

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., *et al.* (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 39, 782-795.

Biot, C., Rentsch, C.A., Gsponer, J.R., Birkhauser, F.D., Jusforgues-Saklani, H., Lemaitre, F., Auriiau, C., Bachmann, A., Bousso, P., Demangel, C., *et al.* (2012). Preexisting BCG-specific T cells improve intravesical immunotherapy for bladder cancer. *Sci Transl Med* 4, 137ra172.

Bladergroen, B.A., Meijer, C.J., ten Berge, R.L., Hack, C.E., Muris, J.J., Dukers, D.F., Chott, A., Kazama, Y., Oudejans, J.J., van Berkum, O., *et al.* (2002). Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* 99, 232-237.

Boismenu, R., Feng, L., Xia, Y.Y., Chang, J.C., and Havran, W.L. (1996). Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* 157, 985-992.

Bonneville, M., and Scotet, E. (2006). Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Current opinion in immunology* *18*, 539-546.

Borg, C., Terme, M., Taieb, J., Menard, C., Flament, C., Robert, C., Maruyama, K., Wakasugi, H., Angevin, E., Thielemans, K., *et al.* (2004). Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* *114*, 379-388.

Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). AIDS-related malignancies. *Nature reviews Cancer* *2*, 373-382.

Bougnoux, P., Germain, E., Chajes, V., Hubert, B., Lhuillery, C., Le Floch, O., Body, G., and Calais, G. (1999). Cytotoxic drugs efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. *British journal of cancer* *79*, 1765-1769.

Bougnoux, P., Hajjaji, N., Ferrasson, M.N., Giraudeau, B., Couet, C., and Le Floch, O. (2009). Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *British journal of cancer* *101*, 1978-1985.

Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002). A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* *297*, 2060-2063.

Bowman, T., Broome, M.A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W.J., Sedivy, J.M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S.A., and Jove, R. (2001). Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 7319-7324.

Boyce, J.A. (2005). Eicosanoid mediators of mast cells: receptors, regulation of synthesis, and pathobiologic implications. *Chem Immunol Allergy* *87*, 59-79.

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* *192*, 1545-1552.

Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Wen, Z., Schreiber, R.D., and Darnell, J.E., Jr. (1996). Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 7673-7678.

Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* *5*, 641-654.

Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., *et al.* (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med* *19*, 57-64.

Burnet, F.M. (1957). Cancer - a biological approach. *British medical journal* *1*, 841-847.

Burnet, F.M. (1964). Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis. *British medical bulletin* *20*, 154-158.

Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research* *13*, 1-27.

Cabrera, T., Angustias Fernandez, M., Sierra, A., Garrido, A., Herruzo, A., Escobedo, A., Fabra, A., and Garrido, F. (1996). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Human immunology* *50*, 127-134.

Calder, P.C. (2005). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc Trans* *33*, 423-427.

Calder, P.C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition* *83*, 1505S-1519S.

- Campos, L., Rouault, J.P., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., Archimbaud, E., Magaud, J.P., and Guyotat, D. (1993). High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* *81*, 3091-3096.
- Camuesco, D., Galvez, J., Nieto, A., Comalada, M., Rodriguez-Cabezas, M.E., Concha, A., Xaus, J., and Zarzuelo, A. (2005). Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. *J Nutr* *135*, 687-694.
- Cannons, J.L., Qi, H., Lu, K.T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., Wakeland, E.K., Germain, R.N., and Schwartzberg, P.L. (2010). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* *32*, 253-265.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Roncador, G., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., Hamoudi, R., Howat, W.J., Montserrat, E., and Campo, E. (2009). High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *27*, 1470-1476.
- Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2007a). Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol* *178*, 179-185.
- Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2007b). Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol* *178*, 172-178.
- Carrington, M., Wang, S., Martin, M.P., Gao, X., Schiffman, M., Cheng, J., Herrero, R., Rodriguez, A.C., Kurman, R., Mortel, R., *et al.* (2005). Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* *201*, 1069-1075.
- Carroll, M.C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* *5*, 981-986.
- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J.P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., *et al.* (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* *120*, 457-471.
- Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Végran, 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.
- Chang, H.C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G.L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.N., Han, L., *et al.* (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* *11*, 527-534.
- Chapman, J.R., Webster, A.C., and Wong, G. (2013). Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* *3*.
- Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* *39*, 1-10.
- Chen, J., and Liu, X. (2009). The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications. *Cellular immunology* *254*, 85-90.



Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* *198*, 1875-1886.

Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B.M., Tato, C., Yoshimura, A., Hennighausen, L., and O'Shea, J.J. (2006). Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 8137-8142.

Chi, H. (2012). Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat Rev Immunol* *12*, 325-338.

Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* *34*, 932-946.

Chung, A.S., Wu, X., Zhuang, G., Ngu, H., Kasman, I., Zhang, J., Vernes, J.M., Jiang, Z., Meng, Y.G., Peale, F.V., *et al.* (2013). An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Med* *19*, 1114-1123.

Clark, W.H., Jr., Elder, D.E., Guerry, D.t., Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., and Halpern, A.C. (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute* *81*, 1893-1904.

Clemente, C.G., Mihm, M.C., Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* *77*, 1303-1310.

Clementi, R., Locatelli, F., Dupre, L., Garaventa, A., Emmi, L., Bregni, M., Cefalo, G., Moretta, A., Danesino, C., Comis, M., *et al.* (2005). A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood* *105*, 4424-4428.

Clifford, G.M., Polesel, J., Rickenbach, M., Dal Maso, L., Keiser, O., Kofler, A., Rapiti, E., Levi, F., Jundt, G., Fisch, T., *et al.* (2005). Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *Journal of the National Cancer Institute* *97*, 425-432.

Colas, S., Maheo, K., Denis, F., Goupille, C., Hoinard, C., Champeroux, P., Tranquart, F., and Bougnoux, P. (2006). Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *12*, 5879-5886.

Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* *14*, 199-220.

Coley, W.B. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clinical orthopaedics and related research*, 3-11.

Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., *et al.* (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol* *11*, 1093-1101.

Collison, L.W., Delgoffe, G.M., Guy, C.S., Vignali, K.M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A.R., Garcia, K.C., Hunter, C.A., Drake, C.G., *et al.* (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol* *13*, 290-299.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566-569.

- Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H.A., Hu-Li, J., Zhu, J., and Paul, W.E. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 3880-3885.
- Coussens, L.M., Zitvogel, L., and Palucka, A.K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* *339*, 286-291.
- Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* *342*, 1432-1433.
- Crome, S.Q., Clive, B., Wang, A.Y., Kang, C.Y., Chow, V., Yu, J., Lai, A., Ghahary, A., Broady, R., and Levings, M.K. (2010). Inflammatory effects of ex vivo human Th17 cells are suppressed by regulatory T cells. *J Immunol* *185*, 3199-3208.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* *29*, 621-663.
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* *41*, 529-542.
- Crowe, N.Y., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2002). A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med* *196*, 119-127.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* *10*, 942-949.
- Dalton, J.E., Howell, G., Pearson, J., Scott, P., and Carding, S.R. (2004). Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J Immunol* *173*, 3660-3667.
- Danesi, F., Philpott, M., Huebner, C., Bordonni, A., and Ferguson, L.R. (2010). Food-derived bioactives as potential regulators of the IL-12/IL-23 pathway implicated in inflammatory bowel diseases. *Mutation research* *690*, 139-144.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., *et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* *9*, 1347-1355.
- Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* *47*, 450-455.
- DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer metastasis reviews* *29*, 309-316.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., and Coussens, L.M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer cell* *16*, 91-102.
- Dhodapkar, M.V. (2005). Immune response to premalignancy: insights from patients with monoclonal gammopathy. *Ann N Y Acad Sci* *1062*, 22-28.
- Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K.M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* *8*, 145-153.
- Doll, R., and Kinlen, L. (1970). Immunosurveillance and cancer: epidemiological evidence. *British medical journal* *4*, 420-422.

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

Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., and Ruddle, N.H. (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* 7, 344-353.

Du, J.W., Xu, K.Y., Fang, L.Y., and Qi, X.L. (2012). Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer. *Molecular medicine reports* 6, 1099-1102.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., *et al.* (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Sherry, R.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Royal, R.E., Kammula, U., White, D.E., Mavroukakis, S.A., *et al.* (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 2346-2357.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10, 857-863.

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

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

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

Duong, C.P., Yong, C.S., Kershaw, M.H., Slaney, C.Y., and Darcy, P.K. (2015). Cancer immunotherapy utilizing gene-modified T cells: From the bench to the clinic. *Molecular immunology*.

Dustin, M.L., and Cooper, J.A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 1, 23-29.

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskde* 5, 273-290.

Evans, C.M., and Jenner, R.G. (2013). Transcription factor interplay in T helper cell differentiation. *Briefings in functional genomics* 12, 499-511.

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorioso, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., *et al.* (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119, 3573-3585.

Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol* 10, 375-384.

Finocchiaro, C., Segre, O., Fadda, M., Monge, T., Scigliano, M., Schena, M., Tinivella, M., Tiozzo, E., Catalano, M.G., Pugliese, M., *et al.* (2012). Effect of n-3 fatty acids on patients with advanced lung cancer: a double-blind, placebo-controlled study. *The British journal of nutrition* 108, 327-333.

Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., *et al.* (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* *183*, 2593-2603.

Fradet, V., Cheng, I., Casey, G., and Witte, J.S. (2009). Dietary omega-3 fatty acids, cyclooxygenase-2 genetic variation, and aggressive prostate cancer risk. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *15*, 2559-2566.

Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer* *12*, 298-306.

Fujio, K., Okamura, T., and Yamamoto, K. (2010). The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Advances in immunology* *105*, 99-130.

Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., and Schreiber, H. (2007). The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* *67*, 425; author reply 426.

Gabrilovich, D.I., Ishida, T., Nadaf, S., Ohm, J.E., and Carbone, D.P. (1999). Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *5*, 2963-2970.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* *9*, 162-174.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* *313*, 1960-1964.

Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L.H., Craft, J., and Yin, Z. (2003). Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* *198*, 433-442.

Gati, A., Dorothee, G., Thiery, J., Guerra, N., Richon, C., Gaudin, C., Mami-Chouaib, F., Caignard, A., Diarra-Mehrpour, M., and Chouaib, S. (2003). [Tumor/cytotoxic effector cross-talk in the control of tumor susceptibility to lysis]. *Bulletin du cancer* *90*, 686-694.

Ghebeh, H., Tulbah, A., Mohammed, S., Elkum, N., Bin Amer, S.M., Al-Tweigeri, T., and Dermime, S. (2007). Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. *Int J Cancer* *121*, 751-758.

Giovarelli, M., Musiani, P., Garotta, G., Ebner, R., Di Carlo, E., Kim, Y., Cappello, P., Rigamonti, L., Bernabei, P., Novelli, F., *et al.* (1999). A "stealth effect": adenocarcinoma cells engineered to express TRAIL elude tumor-specific and allogeneic T cell reactions. *J Immunol* *163*, 4886-4893.

Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* *402*, 255-262.

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

Goswami, R., and Kaplan, M.H. (2012). Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. *J Immunol* *189*, 3026-3033.

Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* *23*, 515-548.

Groux, H. (2003). Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation* *75*, 8S-12S.

Grupp, S.A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D.L., Rheingold, S.R., Teachey, D.T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J.F., *et al.* (2013). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine* 368, 1509-1518.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., *et al.* (2013). CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest* 123, 2873-2892.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., *et al.* (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-1366.

Han, S., Koo, D., Kang, N., Yoon, W., Kang, G., Kang, H., and Yoo, E. (2014). Docosahexaenoic Acid Alleviates Atopic Dermatitis by Generating Tregs and IL-10/TGF-beta-Modified Macrophages via a TGF-beta-Dependent Mechanism. *J Invest Dermatol.*

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

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. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.

Harris, T.J., Grosso, J.F., Yen, H.R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E.L., Getnet, D., Goldberg, M.V., Maris, C.H., *et al.* (2007). Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 179, 4313-4317.

Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., and Nakachi, K. (2006). Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res* 66, 563-570.

Heidelberger, C. (1975). Chemical carcinogenesis. *Annual review of biochemistry* 44, 79-121.

Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., and Ungefroren, H. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* 19, 5477-5486.

Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. (2006). Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol Immunother* 55, 1584-1589.

Hollenbeak, C.S., Todd, M.M., Billingsley, E.M., Harper, G., Dyer, A.M., and Lengerich, E.J. (2005). Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. *Cancer* 104, 1962-1967.

Honda, K., and Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6, 644-658.

Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Jr., Murphy, A.J., *et al.* (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 491, 259-263.

Hudert, C.A., Weylandt, K.H., Lu, Y., Wang, J., Hong, S., Dignass, A., Serhan, C.N., and Kang, J.X. (2006). Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11276-11281.

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.

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

INCa (2014). *Les cancers en France en 2013*. Collection état des lieux et des connaissances.

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

Jabeen, R., Goswami, R., Awe, O., Kulkarni, A., Nguyen, E.T., Attenasio, A., Walsh, D., Olson, M.R., Kim, M.H., Tepper, R.S., *et al.* (2013). Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J Clin Invest* 123, 4641-4653.

Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 183, 7169-7177.

Jager, E., Ringhoffer, M., Karbach, J., Arand, M., Oesch, F., and Knuth, A. (1996). Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer* 66, 470-476.

Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.

Jena, B., Dotti, G., and Cooper, L.J. (2010). Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood* 116, 1035-1044.

Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Itano, A., and Pape, K.A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* 19, 23-45.

Jensen, M.C., and Riddell, S.R. (2015). Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. *Current opinion in immunology* 33C, 9-15.

Jiang, R., Wang, H., Deng, L., Hou, J., Shi, R., Yao, M., Gao, Y., Yao, A., Wang, X., Yu, L., *et al.* (2013). IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC cancer* 13, 59.

Johnsen, H.E., Kjeldsen, M.K., Urup, T., Fogd, K., Pilgaard, L., Boegsted, M., Nyegaard, M., Christiansen, I., Bukh, A., and Dybkaer, K. (2009). Cancer stem cells and the cellular hierarchy in haematological malignancies. *Eur J Cancer* 45 Suppl 1, 194-201.

Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325, 1006-1010.

Jordan, C.T., Guzman, M.L., and Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *The New England journal of medicine* 355, 1253-1261.

Jutel, M., and Akdis, C.A. (2008). T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chemical immunology and allergy* 94, 158-177.

Kagami, S., Rizzo, H.L., Lee, J.J., Koguchi, Y., and Blauvelt, A. (2010). Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 130, 1373-1383.

Kano, S., Sato, K., Morishita, Y., Vollstedt, S., Kim, S., Bishop, K., Honda, K., Kubo, M., and Taniguchi, T. (2008). The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. *Nat Immunol* 9, 34-41.

Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 7556-7561.

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

Kapp, J.A., Kapp, L.M., McKenna, K.C., and Lake, J.P. (2004). gammadelta T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses *ex vivo*. *Immunology* *111*, 155-164.

Kara, E.E., Comerford, I., Bastow, C.R., Fenix, K.A., Litchfield, W., Handel, T.M., and McColl, S.R. (2013). Distinct chemokine receptor axes regulate Th9 cell trafficking to allergic and autoimmune inflammatory sites. *J Immunol* *191*, 1110-1117.

Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* *5*, 749-759.

Karrison, T.G., Ferguson, D.J., and Meier, P. (1999). Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *Journal of the National Cancer Institute* *91*, 80-85.

Kelley, D.S., Nelson, G.J., Branch, L.B., Taylor, P.C., Rivera, Y.M., and Schmidt, P.C. (1992). Salmon diet and human immune status. *European journal of clinical nutrition* *46*, 397-404.

Kerbel, R., and Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature reviews Cancer* *2*, 727-739.

Khong, H.T., Wang, Q.J., and Rosenberg, S.A. (2004). Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J Immunother* *27*, 184-190.

Kim, H.J., Vosseler, C.A., Weber, P.C., and Erl, W. (2005). Docosahexaenoic acid induces apoptosis in proliferating human endothelial cells. *Journal of cellular physiology* *204*, 881-888.

Klein, G. (1966). Tumor antigens. *Annual review of microbiology* *20*, 223-252.

Klotz, L., Burgdorf, S., Dani, I., Saijo, K., Flossdorf, J., Hucke, S., Alferink, J., Nowak, N., Beyer, M., Mayer, G., *et al.* (2009). The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med* *206*, 2079-2089.

Knight, S.C. (2008). Specialized perinodal fat fuels and fashions immunity. *Immunity* *28*, 135-138.

Knosp, C.A., and Johnston, J.A. (2012). Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology* *135*, 101-111.

Kobayashi, N. (1985). Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodeficiency syndrome. *Japanese journal of clinical oncology* *15 Suppl 1*, 307-312.

Koch, C., Dolle, S., Metzger, M., Rasche, C., Jungclas, H., Ruhl, R., Renz, H., and Worm, M. (2008). Docosahexaenoic acid (DHA) supplementation in atopic eczema: a randomized, double-blind, controlled trial. *The British journal of dermatology* *158*, 786-792.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* *450*, 903-907.

Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A.L., and Gatter, K.C. (1996). Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *British journal of cancer* *73*, 148-153.

Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* *448*, 484-487.

Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., *et al.* (2009a). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* *114*, 1141-1149.

Kryczek, I., Lin, Y., Nagarsheth, N., Peng, D., Zhao, L., Zhao, E., Vatan, L., Szeliga, W., Dou, Y., Owens, S., *et al.* (2014). IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* *40*, 772-784.

Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., and Zou, W. (2009b). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* *114*, 357-359.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* *30*, 16-34.

Kusmartsev, S., and Gabrilovich, D.I. (2006). Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol Immunother* *55*, 237-245.

Kuzin, Il, Ugine, G.D., Barth, R.K., Shultz, L.D., Nahm, M.H., Young, F.M., and Bottaro, A. (2004). A new murine model of humoral immuno-deficiency specifically affects class switching to T-independent antigens. *European journal of immunology* *34*, 1807-1816.

Kwon, H., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Kim, H.P., Oh, J., Tunyaplin, C., Carotta, S., Donovan, C.E., Goldman, M.L., Taylor, P., *et al.* (2009). Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity* *31*, 941-952.

Ladoire, S., Martin, F., and Ghiringhelli, F. (2011). Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* *60*, 909-918.

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.

Lanier, L.L. (2000). The origin and functions of natural killer cells. *Clinical immunology* *95*, S14-18.

Lazarevic, V., Chen, X., Shim, J.H., Hwang, E.S., Jang, E., Bolm, A.N., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Glimcher, L.H. (2011). T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. *Nat Immunol* *12*, 96-104.

Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* *4*, 1009-1015.

Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* *14*, 461-470.

Lee, K., Min, H.J., Jang, E.J., Hong, J.H., and Hwang, E.S. (2010). In vivo tumor suppression activity by T cell-specific T-bet restoration. *Int J Cancer* *127*, 2129-2137.

Leek, R.D., Talks, K.L., Pezzella, F., Turley, H., Campo, L., Brown, N.S., Bicknell, R., Taylor, M., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2002). Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer Res* *62*, 1326-1329.



- Leonard, W.J., and Spolski, R. (2005). Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 5, 688-698.
- Lewis, C.E., and Pollard, J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66, 605-612.
- Li, C., Ebert, P.J., and Li, Q.J. (2013). T cell receptor (TCR) and transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling converge on DNA (cytosine-5)-methyltransferase to control forkhead box protein 3 (foxp3) locus methylation and inducible regulatory T cell differentiation. *J Biol Chem* 288, 19127-19139.
- Li, Z., Jiang, J., Wang, Z., Zhang, J., Xiao, M., Wang, C., Lu, Y., and Qin, Z. (2008). Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer Res* 68, 8687-8694.
- Li, Z., Zhang, Y., and Sun, B. (2011). Current understanding of Th2 cell differentiation and function. *Protein & cell* 2, 604-611.
- Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., *et al.* (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15137-15142.
- Liu, X., Chen, X., Zhong, B., Wang, A., Wang, X., Chu, F., Nurieva, R.I., Yan, X., Chen, P., van der Flier, L.G., *et al.* (2014). Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* 507, 513-518.
- Locksley, R.M. (2009). Nine lives: plasticity among T helper cell subsets. *J Exp Med* 206, 1643-1646.
- Lohr, J., Knoechel, B., Jiang, S., Sharpe, A.H., and Abbas, A.K. (2003). The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol* 4, 664-669.
- Loser, K., Scherer, A., Krummen, M.B., Varga, G., Higuchi, T., Schwarz, T., Sharpe, A.H., Grabbe, S., Bluestone, J.A., and Beissert, S. (2005). An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice. *J Immunol* 174, 5298-5305.
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., *et al.* (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest* 122, 4160-4171.
- Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012, 925135.
- Lugo-Villarino, G., Maldonado-Lopez, R., Possemato, R., Penaranda, C., and Glimcher, L.H. (2003). T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7749-7754.
- MacKie, R.M., Reid, R., and Junor, B. (2003). Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *The New England journal of medicine* 348, 567-568.
- Maniar, A., Zhang, X., Lin, W., Gastman, B.R., Pauza, C.D., Strome, S.E., and Chapoval, A.I. (2010). Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood* 116, 1726-1733.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 23, 549-555.

- Marrack, P., Kappler, J., and Mitchell, T. (1999). Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 189, 521-530.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 6, 823-835.
- Marshak-Rothstein, A., and Rifkin, I.R. (2007). Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 25, 419-441.
- 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.
- Martinez, G.J., Zhang, Z., Chung, Y., Reynolds, J.M., Lin, X., Jetten, A.M., Feng, X.H., and Dong, C. (2009). Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. *J Biol Chem* 284, 35283-35286.
- 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. *Nat Immunol* 8, 1390-1397.
- Medawar, P.B. (1944). The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *Journal of anatomy* 78, 176-199.
- Medema, J.P., de Jong, J., Peltenburg, L.T., Verdegaal, E.M., Gorter, A., Bres, S.A., Franken, K.L., Hahne, M., Albar, J.P., Melief, C.J., *et al.* (2001). Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11515-11520.
- Medema, J.P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C.J., and Offringa, R. (1999). Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 190, 1033-1038.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135-145.
- Meloni, F., Morosini, M., Solari, N., Passadore, I., Nascimbene, C., Novo, M., Ferrari, M., Cosentino, M., Marino, F., Pozzi, E., *et al.* (2006). Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Human immunology* 67, 1-12.
- Menetrier-Caux, C., Faget, J., Biota, C., Gobert, M., Blay, J.Y., and Caux, C. (2012). Innate immune recognition of breast tumor cells mediates CCL22 secretion favoring Treg recruitment within tumor environment. *Oncoimmunology* 1, 759-761.
- Menetrier-Caux, C., Montmain, G., Dieu, M.C., Bain, C., Favrot, M.C., Caux, C., and Blay, J.Y. (1998). Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92, 4778-4791.
- Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E.P., Shete, S., Naftalis, E.Z., Huth, J.F., Beitsch, P.D., Leitch, M., Hoover, S., Euhus, D., *et al.* (2004). Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 8152-8162.
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 54, 903-913.

Monk, J.M., Hou, T.Y., Turk, H.F., McMurray, D.N., and Chapkin, R.S. (2013). n3 PUFAs reduce mouse CD4+ T-cell ex vivo polarization into Th17 cells. *The Journal of nutrition* *143*, 1501-1508.

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

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* *7*, 145-173.

Mukutmoni-Norris, M., Hubbard, N.E., and Erickson, K.L. (2000). Modulation of murine mammary tumor vasculature by dietary n-3 fatty acids in fish oil. *Cancer letters* *150*, 101-109.

Mule, J.J., Shu, S., Schwarz, S.L., and Rosenberg, S.A. (1984). Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* *225*, 1487-1489.

Muller, A.J., Sharma, M.D., Chandler, P.R., Duhadaway, J.B., Everhart, M.E., Johnson, B.A., 3rd, Kahler, D.J., Pihkala, J., Soler, A.P., Munn, D.H., *et al.* (2008). Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 17073-17078.

Mumprecht, S., Schurch, C., Schwaller, J., Solenthaler, M., and Ochsenbein, A.F. (2009). Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* *114*, 1528-1536.

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., Borman, Z.A., Kerkar, S.P., Klebanoff, C.A., Ji, Y., Sanchez-Perez, L., Sukumar, M., Reger, R.N., Yu, Z., Kern, S.J., *et al.* (2011). Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity* *35*, 972-985.

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

Muranski, P., and Restifo, N.P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* *121*, 2402-2414.

Murphy, R.A., Mourtzakis, M., Chu, Q.S., Baracos, V.E., Reiman, T., and Mazurak, V.C. (2011). Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* *117*, 3774-3780.

Nieto, N., Torres, M.I., Rios, A., and Gil, A. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *The Journal of nutrition* *132*, 11-19.

Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., *et al.* (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* *21*, 2000-2008.

Noman, M.Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., and Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med* *211*, 781-790.

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

Nunez, S., Saez, J.J., Fernandez, D., Flores-Santibanez, F., Alvarez, K., Tejon, G., Ruiz, P., Maldonado, P., Hidalgo, Y., Manriquez, V., *et al.* (2013). T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology* 139, 61-71.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001-1005.

O'Shea, J.J., Hunter, C.A., and Germain, R.N. (2008). T cell heterogeneity: firmly fixed, predominantly plastic or merely malleable? *Nat Immunol* 9, 450-453.

O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098-1102.

O'Shea, J.J., and Plenge, R. (2012). JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 36, 542-550.

Oestreich, K.J., Huang, A.C., and Weinmann, A.S. (2011). The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med* 208, 1001-1013.

Old, L.J., and Boyse, E.A. (1964). Immunology of Experimental Tumors. *Annual review of medicine* 15, 167-186.

Olver, S., Apte, S.H., Baz, A., Kelso, A., and Kienzle, N. (2013). Interleukin-4-induced loss of CD8 expression and cytolytic function in effector CD8 T cells persists long term in vivo. *Immunology* 139, 187-196.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 29, 71-109.

Pages, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., *et al.* (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 353, 2654-2666.

Pai, S.Y., Truitt, M.L., and Ho, I.C. (2004). GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1993-1998.

Pan, J., Zhang, M., Wang, J., Wang, Q., Xia, D., Sun, W., Zhang, L., Yu, H., Liu, Y., and Cao, X. (2004). Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. *Immunology letters* 94, 141-151.

Pandiyani, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8, 1353-1362.

Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21, 807-839.

Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., *et al.* (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57-63.

Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology* 25, 9543-9553.

Paul, W.E., and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.

Penn, I. (1974). In reference to Rygaard and Povlsen. *Transplantation Letter to Editor* 18, 284-285.

Penn, I. (1999). Posttransplant malignancies. *Transplantation proceedings* 31, 1260-1262.

Pentcheva-Hoang, T., Egen, J.G., Wojnoonski, K., and Allison, J.P. (2004). B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21, 401-413.

Petrella, T.M., Tozer, R., Belanger, K., Savage, K.J., Wong, R., Smylie, M., Kamel-Reid, S., Tron, V., Chen, B.E., Hunder, N.N., *et al.* (2012). Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 3396-3401.

Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131, 959-971.

Pinzon-Charry, A., Ho, C.S., Laherty, R., Maxwell, T., Walker, D., Gardiner, R.A., O'Connor, L., Pyke, C., Schmidt, C., Furnival, C., *et al.* (2005). A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia* 7, 1112-1122.

Pond, C.M. (2002). Adipose tissue, the immune system and exercise fatigue: how activated lymphocytes compete for lipids. *Biochemical Society transactions* 30, 270-275.

Pond, C.M., and Mattacks, C.A. (1998). In vivo evidence for the involvement of the adipose tissue surrounding lymph nodes in immune responses. *Immunology letters* 63, 159-167.

Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C.H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine* 365, 725-733.

Pot, C., Apetoh, L., Awasthi, A., and Kuchroo, V.K. (2011). Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27. *Semin Immunol* 23, 438-445.

Pot, C., Jin, H., Awasthi, A., Liu, S.M., Lai, C.Y., Madan, R., Sharpe, A.H., Karp, C.L., Miaw, S.C., Ho, I.C., *et al.* (2009). Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J Immunol* 183, 797-801.

Powell, J.D., and Delgoffe, G.M. (2010). The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity* 33, 301-311.

Prehn, R.T., and Main, J.M. (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *Journal of the National Cancer Institute* 18, 769-778.

Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J.F., Liu, L., Lim, H.K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., *et al.* (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332, 65-68.

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

Qin, H., Wang, L., Feng, T., Elson, C.O., Niyongere, S.A., Lee, S.J., Reynolds, S.L., Weaver, C.T., Roarty, K., Serra, R., *et al.* (2009). TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J Immunol* 183, 97-105.

Qin, S., Ma, S., Huang, X., Lu, D., Zhou, Y., and Jiang, H. (2014). Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 26, 135-141.

Rakhra, K., Bachireddy, P., Zabuawala, T., Zeiser, R., Xu, L., Kopelman, A., Fan, A.C., Yang, Q., Braunstein, L., Crosby, E., *et al.* (2010). CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation. *Cancer cell* 18, 485-498.

Rawal, S., Chu, F., Zhang, M., Park, H.J., Nattamai, D., Kannan, S., Sharma, R., Delgado, D., Chou, T., Lin, H.Y., *et al.* (2013). Cross talk between follicular Th cells and tumor cells in human follicular lymphoma promotes immune evasion in the tumor microenvironment. *J Immunol* *190*, 6681-6693.

Rebe, C., Végran, F., Berger, H., and Ghiringhelli, F. (2013). STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. *JAKSTAT* *2*, e23010.

Reinhardt, R.L., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* *10*, 385-393.

Rengarajan, J., Mowen, K.A., McBride, K.D., Smith, E.D., Singh, H., and Glimcher, L.H. (2002). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* *195*, 1003-1012.

Restifo, N.P., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J.W., Mule, J.J., Rosenberg, S.A., and Bennink, J.R. (1993). Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* *177*, 265-272.

Restifo, N.P., Marincola, F.M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J.R., and Rosenberg, S.A. (1996). Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* *88*, 100-108.

Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A., and Dudley, M.E. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* *8*, 299-308.

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

Rosenberg, S.A., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., and White, D.E. (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *Journal of the National Cancer Institute* *86*, 1159-1166.

Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N.W., Toscano, M.A., Ilarregui, J.M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O.L., and Rabinovich, G.A. (2004). Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer cell* *5*, 241-251.

Rygaard, J., and Povlsen, C.O. (1974a). Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation* *17*, 135-136.

Rygaard, J., and Povlsen, C.O. (1974b). The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Section B: Microbiology and immunology* *82*, 99-106.

Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews* *212*, 8-27.

Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., *et al.* (2001). Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *European journal of immunology* *31*, 3138-3146.

Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* *192*, 1553-1562.

Schley, P.D., Brindley, D.N., and Field, C.J. (2007). (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *The Journal of nutrition* *137*, 548-553.

Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.E., Munagala, I., Bourdery, L., Venuprasad, K., Banchereau, J., and Ueno, H. (2014). The cytokine TGF-beta co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol* 15, 856-865.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* 75, 163-189.

Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., and Serhan, C.N. (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869-874.

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.

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

Shibata, N., Kawaguchi-Niida, M., Yamamoto, T., Toi, S., Hirano, A., and Kobayashi, M. (2008). Effects of the PPARgamma activator pioglitazone on p38 MAP kinase and IkappaBalpha in the spinal cord of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 28, 387-398.

Shimizu, T., Igarashi, J., Ohtuka, Y., Oguchi, S., Kaneko, K., and Yamashiro, Y. (2001). Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E on colonic mucosal leukotriene generation, lipid peroxidation, and microcirculation in rats with experimental colitis. *Digestion* 63, 49-54.

Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M.G., Rimoldi, M., Biswas, S.K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in cancer biology* 18, 349-355.

Sica, A., Sacconi, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., van Damme, J., and Mantovani, A. (2000). Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 164, 762-767.

Sokol, C.L., Chu, N.Q., Yu, S., Nish, S.A., Laufer, T.M., and Medzhitov, R. (2009). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol* 10, 713-720.

Spiotto, M.T., Yu, P., Rowley, D.A., Nishimura, M.I., Meredith, S.C., Gajewski, T.F., Fu, Y.X., and Schreiber, H. (2002). Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 17, 737-747.

Spite, M., Norling, L.V., Summers, L., Yang, R., Cooper, D., Petasis, N.A., Flower, R.J., Perretti, M., and Serhan, C.N. (2009). Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* 461, 1287-1291.

Spolski, R., and Leonard, W.J. (2010). IL-21 and T follicular helper cells. *International immunology* 22, 7-12.

Spolski, R., and Leonard, W.J. (2014). Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nature reviews Drug discovery* 13, 379-395.

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.

Stary, G., Bangert, C., Tauber, M., Strohal, R., Kopp, T., and Stingl, G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 204, 1441-1451.

Stassen, M., Schmitt, E., and Bopp, T. (2012). From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1247, 56-68.

Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C., *et al.* (2010). Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* 33, 192-202.

Steinke, J.W., and Borish, L. (2001). Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory research* 2, 66-70.

Sterescu, A.E., Rousseau-Harsany, E., Farrell, C., Powell, J., David, M., and Dubois, J. (2006). The potential efficacy of omega-3 fatty acids as anti-angiogenic agents in benign vascular tumors of infancy. *Medical hypotheses* 66, 1121-1124.

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

Sun, T., Zhou, Y., Li, H., Han, X., Shi, Y., Wang, L., Miao, X., Tan, W., Zhao, D., Zhang, X., *et al.* (2005). FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J Exp Med* 202, 967-974.

Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D., and Remington, J.S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240, 516-518.

Swann, J.B., Hayakawa, Y., Zerafa, N., Sheehan, K.C., Scott, B., Schreiber, R.D., Hertzog, P., and Smyth, M.J. (2007). Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J Immunol* 178, 7540-7549.

Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, 627-630.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.

Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* 13, 412-426.

Taniguchi, M., Tashiro, T., Dashtsoodol, N., Hongo, N., and Watarai, H. (2010). The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy. *International immunology* 22, 1-6.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19, 623-655.

Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., Sastre-Garau, X., Couturier, J., Mosseri, V., Vives, V., *et al.* (1999). Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 59, 3698-3704.

Tartour, E., Gey, A., Sastre-Garau, X., Lombard Surin, I., Mosseri, V., and Fridman, W.H. (1998). Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 90, 287-294.

Taube, J.M., Anders, R.A., Young, G.D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T.L., Chen, S., Klein, A.P., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., *et al.* (2012). Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 4, 127ra137.

Terabe, M., Swann, J., Ambrosino, E., Sinha, P., Takaku, S., Hayakawa, Y., Godfrey, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Smyth, M.J., and Berzofsky, J.A. (2005). A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med* 202, 1627-1633.



Terness, P., Bauer, T.M., Rose, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* *196*, 447-457.

Thiebaut, A.C., Chajes, V., Gerber, M., Boutron-Ruault, M.C., Joulin, V., Lenoir, G., Berrino, F., Riboli, E., Benichou, J., and Clavel-Chapelon, F. (2009). Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int J Cancer* *124*, 924-931.

Thies, F., Nebe-von-Caron, G., Powell, J.R., Yaqoob, P., Newsholme, E.A., and Calder, P.C. (2001). Dietary supplementation with gamma-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. *The Journal of nutrition* *131*, 1918-1927.

Thomas, L. (1959). Delayed hypersensitivity in health and disease. In *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*, Lawrence HS (ed.). Hoeber-Harper: New York, 529-532.

Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *The Yale journal of biology and medicine* *55*, 329-333.

Thompson, R.H., Gillett, M.D., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Dong, H., Webster, W.S., Krejci, K.G., Lobo, J.R., Sengupta, S., Chen, L., *et al.* (2004). Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 17174-17179.

Tong, Z., Yang, X.O., Yan, H., Liu, W., Niu, X., Shi, Y., Fang, W., Xiong, B., Wan, Y., and Dong, C. (2012). A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis. *PLoS One* *7*, e34959.

Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology* *24*, 207-212.

Tormo, A.J., Letellier, M.C., Sharma, M., Elson, G., Crabe, S., and Gauchat, J.F. (2012). IL-6 activates STAT5 in T cells. *Cytokine* *60*, 575-582.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* *2*, 735-747.

Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* *10*, 864-871.

Trinchieri, G. (2012). Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu Rev Immunol* *30*, 677-706.

Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* *19*, 641-644.

Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* *7*, 179-190.

Tsuji, M., Murota, S.I., and Morita, I. (2003). Docosapentaenoic acid (22:5, n-3) suppressed tube-forming activity in endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* *68*, 337-342.

Tsushima, F., Yao, S., Shin, T., Flies, A., Flies, S., Xu, H., Tamada, K., Pardoll, D.M., and Chen, L. (2007). Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood* *110*, 180-185.

Tsuzuki, T., Shibata, A., Kawakami, Y., Nakagawa, K., and Miyazawa, T. (2007). Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by suppressing the migration of human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of nutrition* *137*, 641-646.

Ubukata, H., Motohashi, G., Tabuchi, T., Nagata, H., Konishi, S., and Tabuchi, T. (2010). Evaluations of interferon-gamma/interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. *Journal of surgical oncology* *102*, 742-747.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., *et al.* (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological reviews* *219*, 118-142.

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

Uyttenhove, C., Brombacher, F., and Van Snick, J. (2010). TGF-beta interactions with IL-1 family members trigger IL-4-independent IL-9 production by mouse CD4(+) T cells. *European journal of immunology* *40*, 2230-2235.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* *9*, 1269-1274.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* *254*, 1643-1647.

Végran, F., Berger, H., and Apetoh, L. (2013a). Role of IL-17 and IL-17 Family Cytokines on Tumor Development. In *IL-17, IL-22 and Their Producing Cells: Role in Inflammation and Autoimmunity*, V. Quesniaux, B. Ryffel, and F. Di Padova, eds.

Végran, F., Berger, H., Boidot, R., Mignot, G., Bruchard, M., Dosset, M., Chalmin, F., Rebe, C., Derangere, V., Ryffel, B., *et al.* (2014). The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat Immunol* *15*, 758-766.

Végran, F., Mary, R., Gibeaud, A., Mirjolet, C., Collin, B., Oudot, A., Charon-Barra, C., Arnould, L., Lizard-Nacol, S., and Boidot, R. (2013b). Survivin-3B potentiates immune escape in cancer but also inhibits the toxicity of cancer chemotherapy. *Cancer Res* *73*, 5391-5401.

Veldhoen, M. (2010). Interferon regulatory factor 4: combinational control of lymphocyte differentiation. *Immunity* *33*, 141-143.

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.

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

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* *29*, 235-271.

Villablanca, E.J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., Sanvito, F., Ponzoni, M., Valentini, B., Bregni, M., *et al.* (2010). Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* *16*, 98-105.

Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rebe, C., and Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* *70*, 3052-3061.

Vincent, M.S., Roessner, K., Lynch, D., Wilson, D., Cooper, S.M., Tschopp, J., Sigal, L.H., and Budd, R.C. (1996). Apoptosis of Fashigh CD4+ synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J Exp Med* 184, 2109-2117.

Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine* 344, 1058-1066.

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

Wang, L., Yi, T., Zhang, W., Pardoll, D.M., and Yu, H. (2010). IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. *Cancer Res* 70, 10112-10120.

Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., *et al.* (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10, 48-54.

Watowich, S.S., and Liu, Y.J. (2010). Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunological reviews* 238, 76-92.

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.

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., and Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25, 821-852.

Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Al Baz, M.S., Gentz, L.J., Vu Van, D., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., *et al.* (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel-like factor 2. *J Exp Med*.

Weckermann, D., Muller, P., Wawroschek, F., Harzmann, R., Riethmuller, G., and Schlimok, G. (2001). Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value. *The Journal of urology* 166, 699-703.

Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.Y., Watford, W.T., *et al.* (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30, 155-167.

Weiner, H.L., da Cunha, A.P., Quintana, F., and Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunological reviews* 241, 241-259.

Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., *et al.* (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* 209, 1723-1742, S1721.

Weller, M., Malipiero, U., Aguzzi, A., Reed, J.C., and Fontana, A. (1995). Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J Clin Invest* 95, 2633-2643.

Westcott, E., Windsor, A., Mattacks, C., Pond, C., and Knight, S. (2005). Fatty acid compositions of lipids in mesenteric adipose tissue and lymphoid cells in patients with and without Crohn's disease and their therapeutic implications. *Inflammatory bowel diseases* 11, 820-827.

Weylandt, K.H., Nadolny, A., Kahlke, L., Kohnke, T., Schmocker, C., Wang, J., Lauwers, G.Y., Glickman, J.N., and Kang, J.X. (2008). Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis. *Biochim Biophys Acta* 1782, 634-641.

Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., *et al.* (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.

Wrzesinski, S.H., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 5262-5270.

Wynn, T.A. (2003). IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 21, 425-456.

Xing, J., Wu, Y., and Ni, B. (2011). Th9: a new player in asthma pathogenesis? *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 48, 115-125.

Xu, X., Fu, X.Y., Plate, J., and Chong, A.S. (1998). IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 58, 2832-2837.

Yamane, H., and Paul, W.E. (2012). Memory CD4+ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 1577-1583.

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. *J Biol Chem* 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.

Yaqoob, P. (2003). Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends in immunology* 24, 639-645.

Ye, Z.J., Zhou, Q., Yin, W., Yuan, M.L., Yang, W.B., Xiang, F., Zhang, J.C., Xin, J.B., Xiong, X.Z., and Shi, H.Z. (2012a). Interleukin 22-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. *Cancer letters* 326, 23-32.

Ye, Z.J., Zhou, Q., Yin, W., Yuan, M.L., Yang, W.B., Xiong, X.Z., Zhang, J.C., and Shi, H.Z. (2012b). Differentiation and immune regulation of IL-9-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186, 1168-1179.

Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E., and Greenberg, P.D. (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16168-16173.

Yki-Jarvinen, H. (2004). Thiazolidinediones. *The New England journal of medicine* 351, 1106-1118.

Youn, J.I., and Gaborilovich, D.I. (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *European journal of immunology* 40, 2969-2975.

Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., *et al.* (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 31, 457-468.

Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., *et al.* (2005). Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 65, 3044-3048.

Zeng, R., Spolski, R., Finkelstein, S.E., Oh, S., Kovanen, P.E., Hinrichs, C.S., Pise-Masison, C.A., Radonovich, M.F., Brady, J.N., Restifo, N.P., *et al.* (2005). Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8<sup>+</sup> T cell expansion and function. *J Exp Med* 201, 139-148.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., *et al.* (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 348, 203-213.

Zhang, L., Li, J.M., Liu, X.G., Ma, D.X., Hu, N.W., Li, Y.G., Li, W., Hu, Y., Yu, S., Qu, X., *et al.* (2011). Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of clinical immunology* 31, 606-614.

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

Zhou, L., Chong, M.M., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4<sup>+</sup> T cell lineage differentiation. *Immunity* 30, 646-655.

Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8, 967-974.

Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M., Ivanov, 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 RORgamma1 function. *Nature* 453, 236-240.

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

Zhu, J., Guo, L., Min, B., Watson, C.J., Hu-Li, J., Young, H.A., Tschlis, P.N., and Paul, W.E. (2002). Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity* 16, 733-744.

Zhu, J., Guo, L., Watson, C.J., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2001). Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* 166, 7276-7281.

Zhu, J., Jankovic, D., Grinberg, A., Guo, L., and Paul, W.E. (2006a). Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18214-18219.

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

Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell research* 20, 4-12.

Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2006b). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell research* 16, 3-10.

Zhuang, Y., Peng, L.S., Zhao, Y.L., Shi, Y., Mao, X.H., Guo, G., Chen, W., Liu, X.F., Zhang, J.Y., Liu, T., *et al.* (2012). Increased intratumoral IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer Immunol Immunother* 61, 1965-1975.

Zitvogel, L., Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). [Immunological aspects of anticancer chemotherapy]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 192, 1469-1487; discussion 1487-1469.

## **ANNEXES**

*Annexe 1*

« Role of IL-17 and IL-17 Family Cytokines on Tumor Development »

# Role of IL-17 and IL-17 Family Cytokines on Tumor Development

Frédérique Végran, Hélène Berger, and Lionel Apetoh

**Abstract** Anticancer immune responses restrain tumor progression, but persistent immune activation can induce chronic inflammation that contributes to tumor development. The IL-17 family of cytokines comprises six family members (IL-17A to IL-17F) that all contribute to tissue inflammation. Interleukin-17A (IL-17A), the original member of this family, is also the signature cytokine of the recently identified proinflammatory T helper 17 (Th17) cell subset that has been shown to contribute to autoimmunity. Despite their well-characterized proinflammatory functions *in vivo*, the role of IL-17 cytokine family members on tumor progression remains highly controversial. In this chapter, we review the latest findings on the functions of IL-17 family members in cancer and discuss the potential of these molecules as therapeutic targets.

**Keywords** Inflammation • Cancer • Interleukin-17 • Immunomodulation • Anti-cancer immunity • Dendritic cells • T cells • Innate immunity • Adaptive immunity • Chemotherapy

## 1 Introduction: Inflammation, Cancer, and IL-17 Cytokine Family Members

Early oncogenesis results from genetic mutations leading to altered protein signaling pathways within cells that trigger their transformation. Cancer cells provide their own growth signals, are insensitive to growth-inhibitory signals, evade cell

---

F. Végran • H. Berger  
INSERM, U866, 7bd Jeanne d'Arc, Dijon 21000, France

L. Apetoh (✉)  
INSERM, U866, 7bd Jeanne d'Arc, Dijon 21000, France

Centre Georges François Leclerc, Dijon, France  
e-mail: [lionel.apetoh@yahoo.fr](mailto:lionel.apetoh@yahoo.fr)

V. Quesniaux et al. (eds.), *IL-17, IL-22 and Their Producing Cells: Role in Inflammation and Autoimmunity*, Progress in Inflammation Research, DOI 10.1007/978-3-0348-0522-3\_16, © Springer Basel 2013



death, have unlimited replicative potential, promote angiogenesis, and metastasize to other tissues, ultimately resulting in tumor development [1]. While cell-intrinsic properties determine tumor cell aggressiveness [2, 3], the tumor microenvironment has also been shown to critically contribute to tumor progression [4–6]. Cancers are indeed composed of multiple cell types, including innate and adaptive immune cells that have a profound impact on tumor progression [7]. However, immune activation during tumor progression can lead to contrasting outcomes. Chronic activation of immune effector cells by tumor cells triggers the release of proinflammatory cytokines, chemokines, and other bioactive mediators, thereby creating an inflammatory milieu that favors tumor progression [8, 9]. In contrast, the immunosurveillance concept initially brought up by Burnet in 1957 and later substantiated by mouse and human findings states the immune system is capable of limiting tumor development [10, 11]. Immune effectors involved in the elimination of tumor cells include gamma delta T cells [12], natural killer (NK) cells [13], dendritic cells (DCs) [14], and natural killer T (NKT) cells [15], as well as members of adaptive immune responses (B and T cells) [16]. The contribution of innate and adaptive immune responses to the success of anticancer therapies has also been studied in mice and humans suffering from cancer [17, 18]. Investigations revealed that the efficacy of radiotherapeutic and chemotherapeutic regimens does not only rely on their direct cytotoxic effects on tumor cells but also on their ability to trigger the release of danger signals from tumor cells that in turn induce antitumor immune responses [17, 19]. These observations suggest paradoxical roles of the immune system during tumor progression and provide impetus to study the series of events set off by inflammatory responses in cancer.

Interleukin-17A (IL-17A), also commonly called IL-17, is produced by a recently discovered CD4<sup>+</sup> T cell subset named Th17 cells. In addition to IL-17A, Th17 cells are characterized by their secretion of IL-17F, IL-21, and IL-22 and their expression of the IL-23 receptor (IL-23R) [20]. Th17 development is induced by IL-6 and TGF- $\beta$ , and the IL-12 family member IL-23 maintains Th17 cell activity [21]. Increased understanding of Th17 cell functions has unraveled important roles for IL-17A in the development of autoimmune diseases as well as in protective mechanisms against bacterial or fungal infections, functions that were previously ascribed to Th1 or Th2 cells [22]. Th17 cells have emerged as key participants in a wide range of autoimmune disorders, including inflammatory bowel disease, psoriasis, multiple sclerosis, and ankylosing spondylitis [23]. Accordingly, elevated amounts of IL-17A and IL-17F are detected in several autoimmune diseases including (MS) [24], rheumatoid arthritis (RA) [25], and psoriasis [26], and the involvement of Th17 cells in tissue inflammation was confirmed in mouse models where IL-17-neutralizing antibodies alleviate disease [27, 28].

IL-17A is the original member of a group of 6 cytokines IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (also called IL-25), and IL-17F that share homology in amino acid sequences with highly conserved cysteine residues essential for their 3-dimensional structure. The IL-17R family comprises five members (IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, and IL-17RE) that share sequence homology to the earliest identified member, IL-17RA. Signaling specificity is determined by homo-/

heterodimerization of IL-17 receptors such as homodimers and heterodimers of IL-17A and IL-17F that bind to IL-17RA and IL-17RC heterodimers, while IL-17E signals through the IL-17RA and IL-17RB heterodimers. Reported functions for IL-17A, IL-17B, IL-17C, and IL-17F are the induction of proinflammatory cytokines from fibroblasts and peritoneal exudate cells and the promotion of neutrophil migration. By contrast, IL-17E seems to support Th2 responses, suggesting that IL-17 family members could have distinct functions in pathological situations. In a cancer setting, the functional roles of IL-17 family members are beginning to be understood but remain highly controversial. In this chapter, we review the recent studies that addressed the impact of IL-17 family cytokines on tumor development.

## **2 A Controversial Role of IL-17A/F in Tumor Progression**

### ***2.1 IL-17A/F and Tumor Angiogenesis***

The effects of IL-17A on cancer progression have been explored in seminal studies from Tartour et al. [29]. Using cervical cancer cells, the authors showed that neither direct addition of recombinant IL-17A nor IL-17A gene transduction altered the growth of cervical tumors in vitro. However, IL-17-expressing cervical tumors grew faster upon transplantation into nude mice, suggesting that IL-17A has indirect tumor-promoting effects in vivo. The authors further noted that increased expression of IL-17A in vivo was associated with macrophage recruitment at the tumor site. Since macrophages are a cellular source of IL-6, which can act as an in vivo paracrine growth factor, this study indicated that the IL-17A tumor-promoting effects could be partly accounted for by IL-6 [29]. The tumor-promoting effects of IL-17A were later reported in additional tumor models such as MCA205 fibrosarcoma and MC38 colon carcinoma [30]. In addition, IL-17A was identified as a CD4 T cell-derived angiogenic factor that favors neovascularization in vivo [30]. While IL-17A had no direct effect on the in vitro proliferation of vascular endothelial cells, it promoted angiogenesis through stimulation of vascular endothelial cell migration and cord formation. Moreover, IL-17A was shown to increase vascular endothelial growth factor (VEGF), keratinocyte chemoattractant (KC), macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), prostaglandins, and nitric oxide (NO) production by fibroblasts, suggesting that IL-17 functions as a CD4 T cell-derived angiogenic mediator involved in inflammatory angiogenesis. CD4 IL-17-expressing T cells infiltrating into tumor tissues may stimulate tumor cells and stromal fibroblasts to secrete proinflammatory and proangiogenic factors such as VEGF, which inhibits dendritic cell development [31], resulting in enhanced tumor growth. Since neovascularization is required for solid tumor growth, these findings illustrate the contribution of IL-17A in promoting tumor growth through enhanced angiogenesis.

The molecular mechanisms accounting for the cancer-promoting activity of IL-17A have been investigated. In the B16 melanoma and MB49 bladder carcinoma tumor models, IL-17A was shown to support tumor outgrowth not only through direct effects on tumor cells but also by affecting tumor-associated stromal cells, which bear IL-17 receptors [32]. In line with previous work of Tartour et al. [29], IL-17 was shown to induce IL-6 production. Subsequent IL-6 release in the tumor microenvironment triggers the activation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 3, which in turn drives the expression of prosurvival and proangiogenic genes. IL-17A was also shown to enhance *de novo* carcinogenesis in the DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis model [33]. IL-17A can therefore support tumor progression by activating the IL-6/Stat3 signaling pathway.

The tumor-promoting functions of IL-17A have also been reported in spontaneous mouse models of cancer. IL-17A was indeed shown to participate in the development of colonic cancer in multiple intestinal neoplasia (Min) mice, a model of familial adenomatous polyposis. Ablation of IL-17A hampered tumor growth in mice bearing a heterozygote mutation in the adenomatous polyposis coli (Apc) gene (Apc(Min/+) mice) [34]. Decreased tumor progression was accompanied by reduced inflammatory cytokine secretion and T cell infiltration. In addition, the absence of IL-17A in Apc(Min/+) CD4 T cells abrogated their capacity to induce colitis in immunodeficient mice upon adoptive transfer. Therefore, in the Min cancer model, CD4 T cell-derived IL-17A promotes spontaneous intestinal tumorigenesis.

As discussed above, Th17 cells, beyond their robust secretion of IL-17A, produce IL-17F. The respective roles of IL-17A and IL-17F in inducing cancer progression have been explored. In an elegant study, Leppkes et al. explored in a mouse model of chronic intestinal inflammation the role of Th17 cells as well as their master transcription factor retinoic acid-related orphan receptor (ROR) $\gamma$ . In an adoptive transfer model of colitis where wild-type CD4 + CD25<sup>-</sup> T cells induce colitis in rag1<sup>-/-</sup> mice, the authors showed the critical involvement of ROR $\gamma$  in the pathogenicity of Th17 cells and the redundant biological effects of IL-17A and IL-17F *in vivo* [35]. Indeed, while the transfer of IL-17A- or IL-17F-deficient CD4 cells induced colitis, mice that received Rorc-deficient T cells or IL-17F-deficient T cells with a neutralizing anti-IL-17A antibody had diminished colitis [35]. The protumor functions of IL-17F have also been illustrated in intestinal tumorigenesis where ablation of IL-17F impeded intestinal tumorigenesis in the small intestine of Apc(Min/+) mice [36]. Altogether, these studies suggest that to alleviate gut inflammation, the targeting of both IL-17A and IL-17F might be required to achieve a marked therapeutic effect.

The roles of IL-17A and IL-17F in tumor progression in humans remain debated. By studying immune-related genes in 125 frozen colorectal tumor specimens, Tosolini et al. found that patients featuring high expression of the Th17 cluster (containing the Rorc and IL-17a genes) in tumor-infiltrating cells had a poor prognosis, possibly suggesting that IL-17A contributes to cancer progression in human colon cancer [37]. The previous findings are in line with the observations made in hepatocellular carcinoma patients, where increased intratumoral

IL-17-producing cells also correlate with poor survival [38]. However, in ovarian cancer, levels of tumor-infiltrating Th17 cells and the levels of ascites IL-17 are reduced in more advanced diseases and positively predict patient outcome [39]. It is likely that IL-17A and IL-17F may play different roles depending on the tumor type and stage, and further work is thus warranted to obtain a comprehensive understanding of the roles of IL-17A and IL-17F in cancer promotion in humans.

## **2.2 *IL-17A Promotes Anticancer CD8 T Cell Responses***

Despite the aforementioned findings suggesting that IL-17A fosters cancer development, observations that adoptive therapy with polarized Th17 cells limits B16F10 melanoma growth suggest that depending on the immunological context, Th17 cells can exert antitumor functions [40, 41]. Martin-Orozco et al. indeed reported an active role of IL-17 in tumor immunosurveillance. They found that interleukin-17A (IL-17A)-deficient mice were more susceptible to developing lung tumors and that adoptive T cell therapy with tumor-specific Th17 cells prevented tumor development. Interestingly, Th17 cells exhibited stronger therapeutic efficacy than Th1 cells. Th17 cells favored dendritic cell recruitment into the tumor tissues and in draining lymph nodes, allowing antitumor CD8<sup>+</sup> T cell priming in the draining lymph nodes. The therapeutic effect of Th17 cells fully relied on their ability to activate tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells, suggesting that Th17 cells induce protective inflammation that promotes the activation of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells.

The anticancer properties of Th17 cells were further shown using MHC class II-restricted, T cell receptor (TCR) transgenic mice that recognize a novel epitope in tyrosine-related protein 1 (TRP-1), an antigen expressed by normal melanocytes and B16 murine melanoma. In this mouse tumor model that mimics human disease, Th17-polarized cells were highly effective at eliminating large B16F10 melanoma tumors [41]. Surprisingly, however, the therapeutic effect of the adoptively transferred Th17 cells was not only dependent on IL-17A but also on IFN- $\gamma$ . These observations are attributable to the ability of Th17 cells to self-renew and persist as IL-17A-secreting cells *in vivo* and to give rise to a Th1-like effector cell progeny [42]. These studies illustrate the discrepant findings regarding the role of IL-17A in immune surveillance and they both suggest that Th17 cells, at least in adoptive transfer settings, can stave off tumor progression. Taking into consideration all these findings will be essential to contemplate the putative use of Th17 cells as a cell therapy strategy for patients suffering from cancer.

## **2.3 *IL-17A Potentiates Anticancer Immune Responses Triggered by Chemotherapy***

Cancer treatment mainly relies on surgery, radiotherapy, cytotoxic chemotherapy, and hormone therapy. Most of these therapies are believed to directly attack and

eradicate tumor cells. This contention was however challenged by observations suggesting that optimal therapeutic effects require the immunoadjuvant effect of tumor cell death induced by cytotoxic anticancer agents [43]. We have subsequently reported that chemotherapy and radiotherapy antitumor effects rely on the immune system of the host. The interaction of the danger signal high-mobility group box 1 protein (HMGB1) released from dying tumor cells with Toll-like receptor 4 (TLR4) on dendritic cells (DCs) was required for the cross presentation of tumor antigens and the promotion of tumor-specific cytotoxic T cell responses and breast cancer patients harboring the loss-of-function Asp299Gly polymorphism of TLR4 relapsed earlier after receiving anthracycline-based chemotherapy [17]. Overall, these findings underscore the need to characterize anticancer immune responses that ensue following cancer treatment [17, 18].

Upon investigating the immune effector cells and molecules that mediate anticancer immune responses in response to chemotherapeutic treatment, the group led by Zitvogel identified a key role of  $\gamma\delta$  T cells, particularly the V $\gamma$ 4- and V $\gamma$ 6-expressing subsets that produce IL-17A, in the antitumor immune response induced by the cytotoxic agents anthracyclines and oxaliplatin [44]. Chemotherapy induced an early infiltration of interleukin (IL)-17-producing  $\gamma\delta$  (V $\gamma$ 4(+) and V $\gamma$ 6(+)) T lymphocytes ( $\gamma\delta$  T17 cells) that preceded the accumulation of CD8 T cells within the tumor bed. The IL-17A–IL-17RA signaling pathway was required for the priming of IFN- $\gamma$ -secreting, antigen-specific T cells by tumor cells exposed to chemotherapy and mice in which the IL-17 signaling pathway was disrupted failed to respond to chemotherapeutic treatment. Importantly, in the authors' settings, IL-17A-producing cells that accumulated in tumors were mostly positive for  $\gamma\delta$  T markers. A contribution of Th17 cells as a source of IL-17A was ruled out by demonstrating that IL-6 and TGF- $\beta$ , two key regulatory cytokines essential for the differentiation of Th17 cells [45, 46], were dispensable for the efficacy of chemotherapy or vaccination with dying tumor cells. Since the authors further reported that IL-17A did not directly induce IFN- $\gamma$  production or enhance proliferation of CD8+ T cells, their results suggest that  $\gamma\delta$  T cells producing IL-17A contribute to the recruitment of antitumor effector CD8 T cells into tumor beds.

The role of IL-17A in staving off tumor growth following chemotherapeutic treatment was further exemplified in mammary adenocarcinoma and fibrosarcoma tumor models where the IL-1 $\beta$ /IL-1R signaling is essential to the therapeutic outcome of doxorubicin treatment. Using IL-17A $^{-/-}$  mice and an anti-IL-17R $\alpha$  mAb, Mattarollo et al. demonstrated the key role of IL-17A in doxorubicin treatment of transplantable mammary tumors and fibrosarcomas generated de novo by MCA [47]. Interestingly, in contrast to the studies of Wang et al. [32], lack of IL-17A did not affect tumor growth in untreated mice, suggesting that IL-17A exerts contrasting effects depending on the tumor model used. Upon testing the role of lymphocytes in doxorubicin therapy of established AT3 mammary tumors and MCA205 fibrosarcomas, Mattarollo et al. found that doxorubicin efficacy in both AT3 and MCA205 tumors was compromised in mice lacking  $\gamma\delta$  T cells.  $\gamma\delta$  T cells that lacked IL-1R lost the capacity to amplify the action of chemotherapy, confirming the causal relationship with IL-1 $\beta$  and IL-17 production from  $\gamma\delta$  T

cells, resulting in IFN- $\gamma$  production from tumor-specific CD8 T cells. Since IL-17 production from  $\gamma\delta$  T cells is dependent on IL-1R signaling and increases CD8 T cell IFN- $\gamma$  responses [48], these findings are in line with previous reports documenting an essential role of IL-1 $\beta$  and CD8 T cells for the efficacy of chemotherapy [49]. Whether IL-17 is a major downstream response cytokine to IL-1 $\beta$  secretion remains to be demonstrated, but these two studies provide important additional data in mammary tumor transplant and de novo fibrosarcoma models to support a role for IL-17A in doxorubicin mechanism of action.

### 3 IL-17E Inhibits Tumor Progression

Like IL-17A, IL-17E has potent inflammatory effects *in vitro* and *in vivo*. Overexpression of IL-17E in mice skews the immune response toward a Th2 pattern and favors eosinophil expansion through IL-5 production. Benatar et al. have investigated the role of IL-17E in tumor progression. For this, the antitumor efficacy of IL-17E was examined in a variety of human tumor xenograft models, including melanoma, breast, lung, colon, and pancreatic cancers. The authors found that recombinant mouse or human IL-17E administration promoted anticancer responses [50]. Using human tumor xenograft models in mice, they further showed that the combination of IL-17E with chemotherapy or immunotherapy agents has a superior ability to prevent tumor outgrowth as compared to either agent alone. IL-17E induced a marked increase in eosinophils in the blood of tumor-bearing mice and the *in vivo* anticancer effects of IL-17E correlated with the splenic eosinophil numbers. In addition, B cells were found to be necessary for IL-17E-mediated antitumor activity [50]. It is noteworthy that the same authors demonstrated that the anticancer effects of Virulizin, an anticancer agent that prevents tumor growth in human tumor xenograft models, relies, at least in part, through its ability to induce IL-17E by B cells [51]. Overall, these findings suggest that the immunomodulatory effects of IL-17E contribute to impede tumor development.

While the previously mentioned findings referred to the immunomodulatory activity of IL-17E, the direct effect of IL-17E on cancer cells remained elusive. In an elegant work, Furuta et al. have investigated the effect of IL-17E on mammary cancer cells [52]. They found that nonmalignant mammary epithelial cells (MECs) secreted IL-17E, which triggers apoptotic cell death of breast cancer cells. Importantly, IL-17E did not affect nonmalignant MECs. In mice, IL-25 treatment was effective at inhibiting tumor growth without any significant side effect to the normal tissues. These findings were further substantiated with the differential expression of the IL-25R, which was expressed in high amounts in tumors from patients with poor prognoses but was low in nonmalignant breast tissue. The IL-25/IL-25R pathway triggered caspase-mediated apoptosis in breast cancer cells [52]. These results provide impetus to the design of novel, effective, and safe breast cancer therapeutics. Indeed, unlike IL-2, which has pleotropic effects on the immune response, administration of IL-25 would only induce apoptosis specifically

in cancer cells that express IL-25R. Since IL-25R is expressed by 19 % of invasive ductal carcinomas in the study from Furuta et al. (13/56), these results may have clinical relevance given the breast cancer prevalence. Thus, the selection of patients with IL-25R overexpressing tumors will be essential to evaluate the putative benefit of IL-17E in the clinical management of breast cancer.

#### **4 An Elusive Contribution of IL-17B, IL-17C, and IL-17D in Tumor Progression**

While IL-17B has been implicated in inflammatory response and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, its role in cancer has not been extensively studied. Furuta et al. propose that IL-17B, which binds IL-25R with a lower affinity than that of IL-25, could endow breast cancer cells with a growth advantage [52]. The authors reported that IL-17B was expressed in most breast cancer cell lines that expressed high amounts of IL-25R, whereas IL-17B was absent from nonmalignant MCF10A cells. Consistently, IL-17B was overexpressed in 12 out of 40 breast cancer specimens examined but undetectable in normal tissues. ShRNA-mediated reduction of IL-17B amounts in breast cancer cells impaired their growth and invasive potentials, while recombinant IL-17B protein did the opposite. Altogether, this study indicates that IL-17B may favor the tumorigenicity of breast cancer cells in an autocrine manner. However, Sanders et al. found that recombinant human IL-17B inhibits endothelial cell–matrix adhesion and cellular migration, suggesting that IL-17B might harbor antiangiogenic properties [53].

The functions of IL-17C and IL-17D have not been explored in a cancer setting. However, it is noteworthy that IL-17C was recently shown to bind to IL-17RE, thereby inducing the expression of a nuclear I $\kappa$ B family member, I $\kappa$ B $\zeta$ , in Th17 cells to potentiate the Th17 cell response [54]. Given the importance of Th17 cells in tumor immunosurveillance as previously discussed in this chapter, we can speculate that IL-17C has the potential ability to shape anticancer immune responses through modulating Th17 cell activities.

#### **5 Concluding Remarks**

IL-17 family members exert contrasting effects on tumor development. While IL-17E seems to be endowed with anticancer properties through the modulation of cancer cell growth and immune activation, IL-17A and IL-17F favor or repress tumor growth according to the tumor type and immune environment. The other members of the IL-17 cytokine family IL-17B, IL-17C, and IL-17D have not yet been fully characterized, and their role in cancer remains unclear. The reported effects of the IL-17 family members are summarized in Table 1.



## Role of IL-17 and IL-17 Family Cytokines on Tumor Development

**Table 1** Proposed pro- and antitumor functions of IL-17 family members during tumor development

Cytokine	Protumor functions	Antitumor functions
IL-17A	Supports angiogenesis [30, 32] Promotes the release of IL-6 [29, 32] Drives intratumor Stat3 activation [32, 33] Promotes gut inflammation and carcinogenesis [34, 35]	Favors CD8 T cell priming [40] Potentiates the anticancer immune response following chemotherapy [44, 47]
IL-17B	Might support cancer cell growth in an autocrine manner [52]	Might harbor antiangiogenic properties [53]
IL-17C	Unknown	Unknown
IL-17D	Unknown	Unknown
IL-17E	None reported	Synergizes with chemotherapy to prevent tumor outgrowth [50] Activates anticancer B cells [50, 51] Triggers apoptotic cell death of malignant breast cancer cells [52]
IL-17F	Promotes gut inflammation and carcinogenesis [35, 36]	None reported

Clinical studies have shown that anti-IL-17A therapies are effective to treat inflammatory diseases such as psoriasis. Thus, the therapeutic use of anti-IL-17A neutralizing antibodies can be contemplated in cancers where IL-17A promotes cancer growth. This therapeutic strategy would have however to be implemented with caution since IL-17A is crucial for the defense against fungal infections. Indeed, treatments with anti-IL-17A might increase the risk of opportunistic infections. It is noteworthy that the studies examining the role of IL-17 in cancer are mainly restricted to studying the role of IL-17A. The neutralization of other IL-17 cytokine members *in vivo* will be determinant to assess their functions in anticancer responses in humans. An understanding of the functions of these cytokines will assist the design of more effective treatments for not only cancer but also autoimmune diseases.

**Acknowledgments** The authors are supported by the INSERM-Région-Bourgogne (H.B.), the Ligue Nationale contre le Cancer (F.V.), and the Agence Nationale de la Recherche [ANR-10-PDOC-014-01] (L.A.). Frédérique Végran and Hélène Berger contributed equally to this work.

## References

1. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70
2. Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT et al (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–536



3. Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, Tsao MS, Yeatman TJ, Gerald WL, Eschrich S, Jurisica I, Giordano TJ, Misek DE et al (2008) Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat Med* 14:822–827
4. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL, Karin M (2009) Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457:102–106
5. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557–563
6. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA (2008) Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 322:1861–1865
7. Liotta LA, Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411:375–379
8. Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D (1999) Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13:1382–1397
9. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6:24–37
10. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991–998
11. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450:903–907
12. Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, Craft J, Yin Z (2003) Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* 198:433–442
13. Borg C, Terme M, Taieb J, Menard C, Flament C, Robert C, Maruyama K, Wakasugi H, Angevin E, Thielemans K et al (2004) Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* 114:379–388
14. Taieb J, Chaput N, Menard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, Pequignot M, Casares N, Terme M, Flament C et al (2006) A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 12:214–219
15. Crowe NY, Smyth MJ, Godfrey DI (2002) A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med* 196:119–127
16. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001) IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107–1111
17. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P et al (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13:1050–1059
18. Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, Kroemer G, Zitvogel L (2008) Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 14:141–151
19. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira JP, Delaloge S et al (2007) The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 220:47–59
20. Yamaguchi T, Sakaguchi S (2006) Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 16:115–123
21. Chen Z, O’Shea JJ (2008) Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 41:87–102
22. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348–2357

## Role of IL-17 and IL-17 Family Cytokines on Tumor Development

23. van den Berg WB, Miossec P (2009) IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 5:549–553
24. Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5:101–104
25. Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB (1999) IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol* 162:1246–1251
26. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD (1998) Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111:645–649
27. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R (2005) Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 237:123–130
28. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173–6177
29. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V et al (1999) Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 59:3698–3704
30. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT (2003) Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101:2620–2627
31. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP (1998) Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92:4150–4166
32. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H (2009) IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 206:1457–1464
33. Wang L, Yi T, Zhang W, Pardoll DM, Yu H (2010) IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. *Cancer Res* 70:10112–10120
34. Chae WJ, Gibson TF, Zelterman D, Hao L, Henegariu O, Bothwell AL (2010) Ablation of IL-17A abrogates progression of spontaneous intestinal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5540–5544
35. Leppkes M, Becker C, Ivanov II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, Pouly S, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD et al (2009) ROR $\gamma$ -expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 136:257–267
36. Chae WJ, Bothwell AL (2011) IL-17F deficiency inhibits small intestinal tumorigenesis in ApcMin/+ mice. *Biochem Biophys Res Commun* 414:31–36
37. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pages F et al (2011) 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
38. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, Li SP, Zheng L (2009) Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 50:980–989
39. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH et al (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114:1141–1149
40. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, Hwu P, Restifo NP, Overwijk WW, Dong C (2009) T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 31:787–798
41. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K et al (2008) Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 112:362–373

42. Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, Sukumar M, Reger RN, Yu Z, Kern SJ et al (2011) Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity* 35:972–985
43. Casares N, Pequignot M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M et al (2005) Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 202:1691–1701
44. Ma Y, Aymeric L, Locher C, Mattarollo SR, Delahaye NF, Pereira P, Boucontet L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Casares N et al (2011) Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med* 208:491–503
45. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR (2006) The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121–1133
46. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, 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
47. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ (2011) Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res* 71:4809–4820
48. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH (2009) Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31:331–341
49. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E et al (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15:1170–1178
50. Benatar T, Cao MY, Lee Y, Lightfoot J, Feng N, Gu X, Lee V, Jin H, Wang M, Wright JA et al (2010) IL-17E, a proinflammatory cytokine, has antitumor efficacy against several tumor types in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 59:805–817
51. Benatar T, Cao MY, Lee Y, Li H, Feng N, Gu X, Lee V, Jin H, Wang M, Der S et al (2008) Virulizin induces production of IL-17E to enhance antitumor activity by recruitment of eosinophils into tumors. *Cancer Immunol Immunother* 57:1757–1769
52. Furuta S, Jeng YM, Zhou L, Huang L, Kuhn I, Bissell MJ, Lee WH (2011) IL-25 causes apoptosis of IL-25R-expressing breast cancer cells without toxicity to nonmalignant cells. *Sci Transl Med* 3:78ra31
53. Sanders AJ, Guo X, Mason MD, Jiang WG (2010) IL-17B can impact on endothelial cellular traits linked to tumour angiogenesis. *J Oncol* 2010:817375
54. Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C (2011) Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity* 35:611–621

*Annexe 2*

« STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape »

# STAT3 activation

## A key factor in tumor immunoescape

Cédric Rébé,<sup>1,2,\*</sup> Frédérique Végran,<sup>1</sup> Hélène Berger<sup>1,3</sup> and François Ghiringhelli<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U866; Dijon, France; <sup>2</sup>Centre Georges François Leclerc; Dijon, France; <sup>3</sup>Faculté de Médecine; Université de Bourgogne; Dijon, France

**Keywords:** STAT3, cancer, T helpers, Th17, Treg, macrophages, dendritic cells, MDSC, immune response

**Abbreviations:** APC, antigen presenting cell; C/EBP, CCAAT-enhancer-binding protein; CD, cluster differentiation; CDK, cyclin dependent kinase; CSF-1, colony stimulating factor-1; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DC, dendritic cell; DC-SIGN, dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin; DNA, deoxyribonucleic acid; EGF, epidermal growth factor; ERK, extracellular signaling regulated kinase; FGF, fibroblast growth factor; FOXP3, forkhead box P3; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GFI-1, growth factor independent-1; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; HSP, heat shock protein; ICAM, intracellular adhesion molecule; IFN, interferon; IL, interleukin; JAK, Janus activated kinase; LPS, lipopolysaccharide; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MDSC, myeloid derived suppressor cell; MHC, major histocompatibility complex; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen; NFκB, nuclear factor-κB; NK, natural killer; NO, nitric oxide; PDGF, platelet-derived growth factor; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PIAS, protein inhibitor of activated STAT; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted; RAR, retinoic acid receptor; RNA, ribonucleic acid; ROR, RAR related orphan receptor; ROS, radical oxygen species; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA; SOCS, suppressor of cytokine signaling; STAT, signal transducer and activator of transcription; TAM, tumor associated macrophages; TCR, T cell receptor; TDE, tumor-derived exosome; TGF, transforming growth factor; Th, T helper cell; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; Treg, regulatory T cell; VEGF, vascular endothelial growth factor

Cancer growth is controlled by cancer cells (cell intrinsic phenomenon), but also by the immune cells in the tumor microenvironment (cell extrinsic phenomenon). Thus cancer progression is mediated by the activation of transcription programs responsible for cancer cell proliferation, but also induced proliferation/activation of immunosuppressive cells such as Th17, Treg or myeloid derived suppressor cells (MDSCs). One of the key transcription factors involved in these pathways is the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). In this review we will focus on STAT3 activation in immune cells, and how it impacts on tumor progression.

### Introduction

STAT3 belongs to the signal transducer and activator of transcription (STAT) family of signal responsive transcription factors which consists of seven members encoded by distinct genes. In non-stimulated cells, STAT3, like other STATs proteins, is kept in an inactive cytoplasmic form. Then, once activated, STAT3 translocates into the nucleus where it behaves as a transcription activator for a broad array of targeted genes. Typically, STAT3

activation is induced by phosphorylation on a critical tyrosine residue (Tyr 705) that triggers STAT3 dimerization thanks to reciprocal phosphotyrosine-SH2 domain interactions.<sup>1</sup> Even if multiple tyrosine kinases have been described as intracellular activators of STAT3 activity (such as EGFR, Src, ERK), the phosphorylation of STAT3 on tyrosine 705 is mainly regulated by members of Janus-activated kinases with JAK1 as key modulator.<sup>2</sup> In addition to tyrosine 705 phosphorylation, STAT3 is also activated through serine (Ser 727) phosphorylation. This phosphorylation is commonly regulated by protein kinase C, mitogen-activated protein kinases, and CDK5. Finally, the reversible acetylation of STAT3 by histone acetyltransferase on a single lysine residue (Lys 685) represents a third mechanism of STAT3 activation.<sup>3</sup> Acetylated STAT3 has been depicted as a way to enhance stability of STAT3 dimers which are required for DNA-binding and transcriptional activity.

Regulation of STATs protein activation is dictated by negative regulators such as PIAS (protein inhibitor of activated STAT) and SOCS (suppressors of cytokine signaling) proteins as well as protein tyrosine phosphatases. SOCS proteins prevent the JAK from activating STAT3 by direct and indirect interactions with tyrosine kinase SH2 domains.<sup>4</sup> They also drive the blockade of STAT3 to bind to receptor subunits. To date, SOCS protein family comprises eight members and SOCS3 seems to be the most specific inhibitor of STAT3 signaling pathway. Contrary to SOCS molecules, PIAS proteins are nuclear factors. They negatively regulate STAT transcriptional activity through several mechanisms, particularly by interacting and thus blocking DNA binding activity.<sup>5</sup> Protein tyrosine phosphatases remove phosphates from activated STATs which represent a third level of

\*Correspondence to: Cédric Rébé and François Ghiringhelli;  
Email: cedricrebe@yahoo.fr and fghiringhelli@cgfl.fr  
Submitted: 10/11/12; Revised: 11/21/12; Accepted: 11/27/12  
Citation: Rébé C, Végran F, Berger H, Ghiringhelli F. STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. JAK-STAT 2013; 2:e23010; http://dx.doi.org/10.4161/jkst.23010

**Table 1.** Main STAT3 modulators and their effects in immune cells

Cell type	pSTAT3 modulators	Effects
<b>CD4<sup>+</sup> T cell</b>	IL-27	↑ proliferation
<b>Th17</b>	IL-6, IL-21, IL-23	↑ ROR $\gamma$ t and ROR $\alpha$ expression and ↑ cell differentiation ↑ IL-21, IL-23R and IL-17
	IL-6 (in combination with TGF- $\beta$ )	↑ CD39 and CD73 expression and ↑ adenosine production
<b>Treg</b>	IL-2	↑ Foxp3 expression (associated with pSTAT5) and ↑ inhibitory functions
	IL-6, IL-27	↓ Foxp3 expression (with an inhibition of pSTAT5 binding) and inhibition of differentiation
		↑ IL-6, TGF- $\beta$ (with Foxp3 cooperation)
<b>Macrophage</b>	IL-6	Inhibition of differentiation
		Inhibition of Ag presentation to CTL, ↑ IL-23 and ↓ IL-12 production
		Inhibition of LPS-mediated cytokine production (e.g., RANTES and IL-12)
	Tumor cell supernatants	↑ IL-10, $\beta$ FGF and VEGF-A production and ↑ angiogenesis
<b>DC</b>		Inhibition of Ag presentation to CTL and ↓ TLR induced IL-12 and TNF- $\alpha$ production
	Tumor cell supernatants, IL-6 and exosomes	↓ differentiation (with an IL-6 amplification loop)
	exosomes	↑ immunosuppressive functions (with an IL-6 amplification loop)
<b>MDSC</b>	Tumor cell supernatant	↑ production of VEGF and $\beta$ FGF and ↑ angiogenesis
		↑ expression of NOX2, ↑ production of ROS and ↑ immunosuppressive functions

STAT modulation. Numerous phosphatases have been described to regulate STAT3, such as PTEN,<sup>6</sup> CD45,<sup>7</sup> SHP-1 and SHP-2.<sup>8,9</sup> Moreover, kinases such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) could regulate STAT3 phosphorylation in a different way, depending on the model used. STAT3 pathway is inhibited by PI3K in melanoma cells, whereas it is activated in laryngeal papillomas or in breast cancer stem-like cells with an emphasis in PTEN deficient cells.<sup>6,10,11</sup> Lastly, STAT3 has also been shown to go through ubiquitination-dependent proteosomal degradation.<sup>12</sup>

It is now well established that STAT3 signaling is a major intrinsic pathway driving apoptosis, inflammation, cellular transformation, survival, proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of cancer.<sup>13,14</sup> However, compelling evidence has now showed that STAT3 is constitutively activated in many human cancers.<sup>15</sup> Indeed, many receptor signaling pathways are excessively stimulated in tumoral context and lead to persistent activation of STAT3. Many regulated genes induced by STAT3 in turn activate the same STAT3 pathways and keep a stable feedforward loop going between tumor cells and tumor-interacting immune cells. In addition, the own tumorigenic properties of STAT3 highlight its oncoprotein status by driving malignant properties related to chronic inflammation.<sup>16,17</sup> Thereby, this explains that STAT3 has been characterized as a central actor for inflammation-induced cancer. STAT3 activation occurs in both cancer and stromal cells thereby allowing a crosstalk between these two cellular types. This activation is rapid and transient under normal biological conditions and mediated by a large number of extracellular stimuli including cytokines (IL-6, IL-10, IFNs, TNF- $\alpha$ ...) and growth factors (i.e., EGF, G-CSF, GM-CSF, VEGF and Her2/Neu). Active oncogenic proteins, such as Src and Ras, as well as chemical carcinogens and other molecules also have the ability to activate STAT3 (see ref. 18 for extensive review).

It is now well established that carcinogenesis induces the appearance of danger signals which could drive tumor rejection

by the immune system (a phenomenon called immunosurveillance). Some cancer cells could escape this rejection by limiting tumor antigen expression (a phenomenon called immunoeediting) or by inducing active immune tolerance mechanisms.<sup>19</sup> These mechanisms include the proliferation and local accumulation of immunosuppressive cells, including regulatory T cells (Tregs), Th17 cells and myeloid-derived immunosuppressive cells (MDSCs). This tolerance (a phenomenon called immunoescape) prevents cancer rejection by the immune system and blunts the efficacy of immunotherapy as demonstrated in several mouse models.<sup>20</sup>

This review is dedicated to the current knowledge of the impact of STAT3 activation in immune cells (summarized in Table 1) on the balance between immunosurveillance and immunoescape.

## STAT3 and T Cells

T lymphocytes or T cells play a central role in the adaptative immune response of the host to cancer.<sup>21</sup> Tumor-infiltrating CD4 and CD8 T cells are associated with clinical outcome and survival in colorectal cancer,<sup>22</sup> breast<sup>23</sup> and lung cancers.<sup>24</sup> CD4 T cells called helper T cells are capital in the generation of T cell immune response by their capacity to drive and coordinate all components of the immune response. Current cancer immunotherapies are therefore designed to induce or enhance T cell reactivity against tumor antigens.<sup>25</sup> Among T cells, different subsets have been described (regulatory T cells, cytotoxic T cells and T helper) with distinct functions that could be regulated by STAT3.

**Th1/Th2.** T helper (Th) cells assist other hematopoietic cells in immunologic processes, including activation of CTL, natural killer (NK) cells and macrophages. Th cells become activated when they are stimulated with antigens presented by MHC class II molecules that are expressed on the surface of antigen



presenting cells (APCs) such as dendritic cells. Once activated, they proliferate rapidly and secrete small proteins called cytokines that regulate or assist the active immune response. These cells can differentiate into one of several subtypes (e.g., Th1, Th2 and Th17), which secrete cytokines to regulate immune response.<sup>26</sup>

The expression levels of Th1 cell genes coding for Interferon- $\gamma$  (IFNG), TAP1 and Granzyme B (GZMB) are significantly higher in colorectal tumors than in normal tissue. This high expression of Th1 cytotoxic genes was associated with significantly improved disease-free survival rates and patients with low expression of those genes had earlier recurrence.<sup>27</sup> Tbet, the master transcriptional regulator for Th1 differentiation is induced by T cell receptors (TCRs) and IL-12 stimulation.<sup>28</sup> In contrast, GATA3 is the master control for Th2 differentiation after stimulation with IL-4.<sup>29</sup> IL-27, a member of the IL-6/IL-12 family produced by macrophages and dendritic cells, favors the Th1/Th2 differentiation balance toward Th1 by upregulating Tbet (independently of STAT1), downregulating GATA3 (through a STAT1-dependent mechanism) and suppressing proinflammatory cytokine production such as IL-2, IL-4, and IL-13.<sup>30</sup> Even if IL-27 activates STAT3, all those events were STAT3-independent. In this context, only the IL-27 dependent CD4<sup>+</sup> T cell proliferation was mediated by STAT3 (with an upregulation of c-myc and pim-1 transcription) and not by STAT1.<sup>30,31</sup>

**Th17.** Th17 cells are CD4<sup>+</sup> T cells induced by TCR triggering with IL-6 and transforming growth factor (TGF)- $\beta$  stimulation. After induction, IL-23, an IL-12 family member, maintains Th17 cell polarization.<sup>32</sup> Th17 cells have emerged as key driver of a wide range of autoimmune disorders, including inflammatory bowel disease, psoriasis and ankylosing spondylitis.<sup>33</sup> Th17 cell expansion was observed in human cancers such as ovarian, melanoma, breast or colon cancers.<sup>34</sup> In colorectal cancer, patients with low expression of Th17 genes seemed to have a prolonged disease-free survival.<sup>27</sup> Despite these early observations, the role of Th17 cells in cancer immunity remains controversial.

Th17 are characterized by the expression of the transcription factors ROR $\gamma$ t and ROR $\alpha$ .<sup>35</sup> In addition, STAT3 is also indispensable for Th17 cell differentiation, because STAT3 ablation in CD4 cells in mice results in an absence of Th17 differentiation.<sup>36</sup> Moreover, many in vitro studies have shown that STAT3 can be activated downstream of receptors for several pro-inflammatory cytokines including IL-6, IL-21 and IL-23 leading to the regulation of ROR $\gamma$ t, ROR $\alpha$ , IL-21, IL-23R and IL-17 expression along with the development and the stabilization of Th17 cells.<sup>37-41</sup> In the absence of STAT3, other signaling pathways are engaged, such as STAT1 pathway, leading to the induction of the Th1 cytokine IFN $\gamma$ .<sup>38</sup>

Our team found that in vitro Th17 cells generated with IL-6 and TGF- $\beta$  and in vivo tumor-infiltrating Th17 cells express CD39 and CD73 ectonucleotidases. This ectonucleotidase catalytic machinery leads to the cleavage of extracellular ATP into the immunosuppressive molecule adenosine which could suppress effector T cells. The expression of ectonucleotidases is dependent on STAT3 and the zinc finger protein growth factor

independent-1 (Gfi-1), which is a transcription repressor. IL-6-driven STAT3 binds to the promoter regions of CD39 and CD73 and TGF- $\beta$ -mediated downregulation of Gfi-1 removes its transcriptional inhibition during Th17 cell differentiation, both leading to the transcription of ectonucleotidases. CD39 expression on Th17 cells promotes tumor growth, suggesting that expression of ectonucleotidases dictates the immunosuppressive fate of Th17 cells in cancer.<sup>42</sup> The generation of Th17 cells from naive T cells activated with IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-23 in the absence of TGF- $\beta$  has been reported. Unlike Th17 cells generated with TGF- $\beta$  and IL-6, these Th17 cells generated without TGF- $\beta$  were highly pathogenic in vivo<sup>43</sup> and failed to express ectonucleotidases.<sup>42</sup> These observations suggest that STAT3 and Gfi-1 determine the effector immunoregulatory fate of Th17 cells through regulation of ectonucleotidase expression.<sup>42</sup>

**Treg.** Regulatory T cells (Treg) are suppressor T cells that maintain peripheral immune tolerance.<sup>44,45</sup> Conversion of naive CD4 T cells in CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Treg cells can be achieved through co-stimulation with TCRs and TGF- $\beta$ . Such stimulation induce the expression of FOXP3 the master transcription factor for Tregs.<sup>46</sup> These T cells accumulate in tumors and in the peripheral blood of patients with cancer<sup>47</sup> and the increased Treg frequency has been generally considered as a marker of poor prognosis in cancer presumably because of Treg-mediated suppression of anti-tumor immunity, which benefits the tumor.<sup>48-50</sup>

The role of STAT3 in regulating *Foxp3* expression by Tregs appears to be context-dependent. In vitro, IL-2 induces the binding of STAT3 and STAT5 to a highly conserved STAT-binding site located within the first intron of the *Foxp3* gene leading to the upregulation of FOXP3 expression in purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells but not in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells.<sup>51</sup>

In tumor-infiltrating Tregs both STAT3 and STAT5 can bind to a STAT consensus site in the *Foxp3* promoter and enhances FOXP3 expression which seems to be important in maintaining Tregs' inhibitory functions.<sup>51-53</sup> Low-dose IL-2 treatment of patients with metastatic cancer or chronic myelogenous leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation resulted in an increase in the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in peripheral blood as well as FOXP3 expression in CD3<sup>+</sup> T cells.<sup>51</sup> In Treg cells, activated STAT3 and FOXP3 interact together and co-operatively regulate IL6 and TGF $\beta$ 1 genes, which likely endow Treg cells with the ability to suppress Th17 cell-mediated inflammation and fatal colitis.<sup>54</sup> In addition, IL-21, which activates STAT3, does not activate STAT5 and has no effect on Treg viability, activation or function.<sup>55</sup> On the contrary, in naive T cells induced to differentiate into Tregs in vitro, IL-6 or IL-27 inhibit the differentiation to the Treg lineage in a STAT3-dependent and STAT1-independent manner.<sup>40,56</sup> In another context, STAT3 binds to a silencer element within the *Foxp3* locus<sup>57</sup> and could also inhibit its STAT5 binding to its binding element in *Foxp3* promoter,<sup>58</sup> both inhibiting FOXP3 expression. Moreover, the modulation of STAT3 activity in Tregs by molecular compounds could lead to an inhibition of their activity. Thus, WP1066 (an inhibitor of STAT3 signaling) enhances T cell cytotoxicity against melanoma through inhibition of FOXP3<sup>+</sup> Tregs, suggesting that STAT3 is required for immunosuppressive functions of Tregs.<sup>59</sup>

## STAT3 and Myeloid Cells

APCs lie at the center of this critical decision of the immune system, since these cells have been shown to capture antigens in the periphery, migrate to the lymphoid organs and present processed peptides to T cells in a way that may lead to either priming tolerance induction.<sup>60</sup>

**Macrophages.** Macrophages can differentiate into two subsets, M1 and M2 macrophages, based on their capacity to produce IL-12 or IL-10, respectively. M1 has potent microbicidal properties and promotes Th1 responses, whereas M2 supports Th2-associated effector functions.<sup>61,62</sup> M2 macrophages are further subdivided into several subtypes including tumor-associated macrophages (TAMs). TAMs accumulate at the tumor site by tumor-derived signals, such as macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) or chemokine (C-C motif) ligand-2 (CCL2). They actively contribute to tumor growth by releasing proangiogenic cytokines and growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), colony stimulating factor-1 (CSF-1), platelet-derived growth factor (PDGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). They also produce arginase-1, IL-10 and TGF- $\beta$ , which inhibit the antitumor function of T cells and natural killer cells leading to tumor tolerance and the impairment of antitumor immunotherapies efficacy.<sup>63-65</sup>

IL-6 inhibition of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)-induced colony formation observed in mice was abolished in mice mutated for the gp130-STAT1/3 signaling, suggesting that the IL-6/STAT3 pathway could regulate macrophage homeostasis.<sup>66</sup>

Cheng et al. were the first to show that disruption of STAT3 signaling in either macrophages or bone marrow-derived dendritic cells (DCs) renders these APCs capable of restoring the responsiveness of tolerant T cells from tumor-bearing mice suggesting an important implication for cancer immunotherapy. The finding that peritoneal elicited macrophages with a targeted disruption of STAT3 have a constitutively activated phenotype and are more prone to produce inflammatory mediators in response to LPS (such as RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, IP-10, IL-6 or IL-12) points to STAT3 signaling as a negative regulatory pathway in these cells. This could be due to an increased STAT1 activity (leading to high production of inflammatory factors e.g., RANTES or IL-12) or a lack of IL-10 production.<sup>67</sup> The same team showed that macrophages derived from conditional STAT3 knockout mice are superior to wild-type macrophages in terms of their ability to prime cognate CTL responses, and to cross-present tumor-derived antigen to CTLs *in vitro* leading to a stronger proliferation of CTLs and an increased production of IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . In the same way, ablating STAT3 in hematopoietic cells results in rapid activation of innate immunity by CpG (a TLR9 ligand), with enhanced production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-12, and activation of macrophages, neutrophils and natural killer cells (which present strong STAT1 activation) and with an eradication of B16 melanoma tumors.<sup>68</sup> Targeting STAT3 signaling represents therefore an enticing strategy to augment CTL responses in the

tumor-bearing host.<sup>69</sup> Immunosuppressive activities of TAMs correlate with over-activated STAT3 signaling of the cells and disruption of STAT3 activity of TAMs can enhance rat immune response to breast cancer.<sup>70</sup> In glioblastoma, tumor-infiltrating macrophages were shown to be predominantly STAT3-positive M2 macrophages which is associated with a poor prognostic for those patients.<sup>71</sup> The same team proposed corosolic acid and oleic acid as new compounds for tumor prevention and therapy through their capacity to suppress M2 polarization of macrophages and tumor cell proliferation by inhibiting STAT3 activation and IL-10 production.<sup>72,73</sup> In intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC), patients with high counts of CD163<sup>+</sup> M2 macrophages showed poor disease-free survival. Tumor cell supernatant from ICC cell lines (such as HuCCT1) induced the production of IL-10 and VEGF-A by macrophages through activation of STAT3 and polarization toward the M2 phenotype.<sup>74</sup> This was confirmed by the fact that macrophages isolated from mouse tumors displayed activated STAT3 and induced angiogenesis in an *in vitro* tube formation assay via STAT3 induction of angiogenic factors, including VEGF and bFGF.<sup>75</sup> STAT3 signaling within the tumor microenvironment induces a procarcinogenic cytokine, IL-23, via direct transcriptional activation of the IL-23/p19 gene in tumor-associated macrophages, while inhibiting a central anticarcinogenic cytokine, IL-12, thereby shifting the balance of tumor immunity toward carcinogenesis.<sup>53</sup> The M-CSF-inducible DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin or CD209) expression along monocyte-to-macrophage differentiation is dependent on JNK and STAT3 activation. This effect is potentiated by STAT3-activating cytokines IL-6 and IL-10 produced by STAT3-activated tumor cells. DC-SIGN contributes to the release of factors (IL-10) that would maintain STAT3 activation in tumor cells, thus implying that DC-SIGN favors the maintenance of an activated STAT3 context in the tumor stroma, which would compromise the ability of tumor-associated macrophages (and DCs) to generate effective antitumor responses and maintain an immunosuppressive environment.<sup>76</sup>

However an anti-tumoral role of STAT3 in macrophages has been proposed. This came from studies that investigated the importance of STAT3 in macrophages through an indirect manner, using SOCS3 conditional knockout mice in macrophage. These macrophages presented a prolonged activation of STAT3 (but also a reduced activation of STAT1) and simultaneously exerted anti-inflammatory (e.g., through IL-6 and TNF $\alpha$  down-regulation) as well as anti-tumor effects (through MCP2/CCL8-mediated anti-metastatic effect).<sup>77</sup> In that respect Lipoxin A4, by inducing the phosphorylation of STAT3, mediates monocyte differentiation into M2 subtypes that present anti-tumorigenic activities.<sup>78</sup> The discrepancies between these studies could be explained by the fact that SOCS3 and lipoxin signaling should regulate other pathways such as NF $\kappa$ B.

Tumor-STAT3 could also modulate macrophage fate. For example, in murine melanomas, natural STAT3 activity is associated with tumor growth and reduction of lymphocytes, NK cells, neutrophils and macrophages infiltration. In addition, blocking STAT3 triggers tumor cells to produce TNF- $\alpha$  and



IFN- $\beta$  capable of activating macrophage production of NO and RANTES in vitro and in vivo, leading to macrophage-mediated, nitrite-dependent cytostatic activity against tumor cells.<sup>79,80</sup> Finally the inhibition of phagocytosis and the secretion of IL-10 induced by glioma cancer stem cells conditioned medium were reversed when the STAT3 pathway was blocked in the glioma cancer stem cells.<sup>81</sup>

**Dendritic cells.** Dendritic cells represent a terminally differentiated stage of monocytes and are the key antigen-presenting cells of the immune system. DCs play a main role as immune sentinels in the initiation of T-cell responses to microbial pathogens, tumors and inflammation.<sup>82,83</sup>

The first evidence that STAT3 is important for DC fate was observed in mice lacking expression of STAT3 in hematopoietic progenitors. These animals present profound deficiency in the DC compartment and abrogated Flt3L effects on DC development.<sup>84</sup> However, the same mice bearing a tumor present enhanced function of dendritic cells, T cells, NK cells and neutrophils, and a decreased tumor progression.<sup>85</sup> DCs derived from *LysMcre/STAT3(flox/flox)* mice displayed higher cytokine production (such as IL-12 and TNF $\alpha$ ) in response to TLR stimulation, activated more efficiently T cells and intratumoral administration of these DCs significantly inhibited MC38 tumor growth.<sup>86</sup> The more important production of IL-12 in STAT3 deficient cells has been attributed to the capacity of STAT3 to suppress NF $\kappa$ B/c-Rel mediated IL-12 transcription.<sup>53</sup> One could speculate that it is also true for TNF $\alpha$ , a known NF $\kappa$ B target gene. Moreover, ablating STAT3 in myeloid cells increases CpG-induced dendritic cell maturation (which present high levels of activated STAT1), T-cell activation, generation of tumor antigen-specific T cells and long-lasting antitumor immunity in B16 melanoma tumor model.<sup>68</sup> In the same way, CpG-bound STAT3 siRNA were used to downregulate STAT3 expression specifically in myeloid and B cells. Then silencing STAT3 in these cells significantly augments dendritic cell engagement and effector functions of adoptively transferred CD8<sup>+</sup> T cells in vivo, with an upregulation of effector molecules such as perforin, granzyme B and IFN- $\gamma$ .<sup>87</sup> The mechanism showing that STAT3-deficient DCs could activate more efficiently T cells than wild-type DCs was completed by Kortylewski et al.<sup>85</sup> Indeed mice lacking STAT3 in myeloid compartment of tumor stroma, including DCs and macrophages, showed reduced numbers of tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>/Lag-3<sup>+</sup> Tregs, which was accompanied by increased CD8<sup>+</sup> effector T cells. Reduced expression of MHC class II and costimulatory molecules due to constitutive STAT3 activation in tumor-residing DCs contribute to the expansion of tumor-infiltrating FOXP3<sup>+</sup> T cells.<sup>85</sup> Finally IL-6 has been shown to be a potent suppressor of bone marrow-derived DC activation/maturation and a regulator of DC differentiation in vivo, through STAT3 phosphorylation. Then an IL-6-gp130-STAT3 amplification loop controls DC differentiation/maturation and may represent a critical target for controlling T cell-mediated immune responses.<sup>88</sup> In this way, mammary tumor-derived exosomes block the differentiation of murine myeloid precursor cells into DCs in vitro. This was associated with an increased level of IL-6 and phosphorylated STAT3 and was blocked when bone marrow cells come from

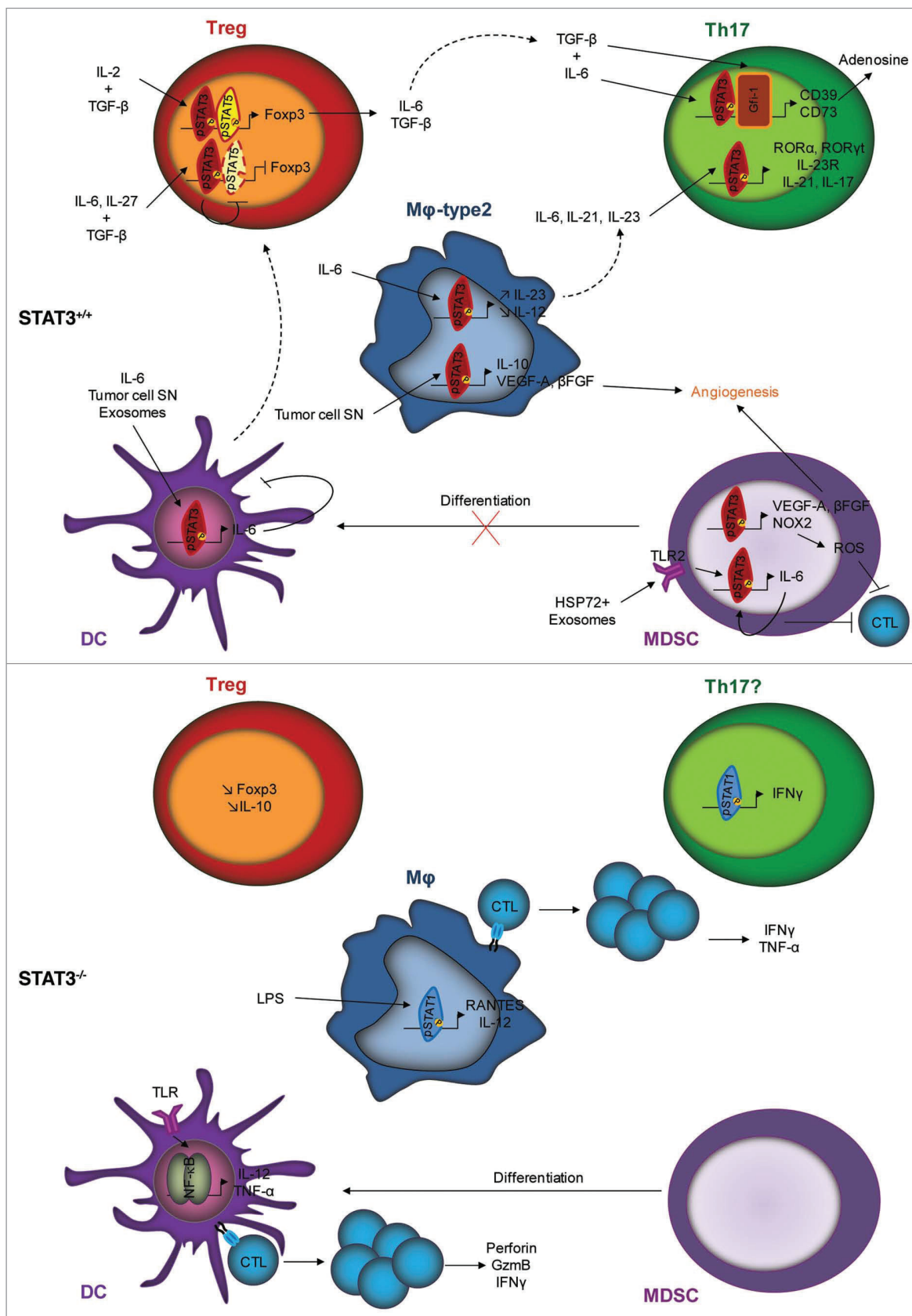
IL-6 knockout mice, suggesting that tumor cells could dampen DC differentiation through an autocrine STAT3 activation by IL-6.<sup>89</sup> IL-6 could also be produced by cancer cells and impact on STAT3 activation in DCs. Thus tumor cell conditioned medium from murine colon carcinoma or fibrosarcoma cells induced activation of JAK2 and STAT3 (but not STAT1 or STAT5), which was associated with an accumulation of immature myeloid cells and an inhibition of their differentiation into mature dendritic cells.<sup>90,92</sup> More precisely, this observation was confirmed by the fact that soluble factors released by pancreatic cancer cells, IL-6 and G-CSF, are responsible for inhibiting DC differentiation and activation respectively in a STAT3-dependent manner.<sup>93</sup>

In humans, STAT3-depleted DCs with adenoviral STAT3 short hairpin RNA (shRNA) were also capable of producing more cytokines under TLR stimulation (such as IL-12 and TNF- $\alpha$ ), and they induced tumor Ag-specific T cells more efficiently than control DCs.<sup>86</sup>

The production by tumor cells of molecules regulating DC activation could be induced by STAT3. Blocking STAT3 in tumor cells (by anti-sense oligonucleotides or STAT3 $\beta$  to displace STAT3 $\alpha$  DNA binding) increases expression of proinflammatory cytokines (such as IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6) and chemokines (RANTES and IP-10) that activate innate immunity and dendritic cells, leading to tumor-specific T-cell responses.<sup>80</sup> On the contrary, constitutive STAT3 activity (by transformation with v-src or transfection with a constitutively active STAT3 i.e., STAT3C) reduces production of pleiotropic factors (e.g., IL-6 and RANTES) and inhibits dendritic cell functional maturation. It is surprising that STAT3 negatively regulates IL-6 production by tumor cells in this context, because IL-6 has been largely described to be a target of STAT3 (for reviews, see refs. 14 and 94). Nevertheless, tumor-derived factors (that were not defined in this study) inhibit dendritic cell maturation through STAT3 activation in progenitor cells.<sup>80</sup>

**MDSCs.** MDSCs have been identified in humans and mice as a population of immature myeloid cells with the ability to suppress T cell activation.<sup>95</sup> In tumor-bearing mice, these cells have been shown to markedly expand in lymphoid organ and blood when mice are inoculated with transplantable tumor cells or when tumors spontaneously develop in transgenic mice with tissue-restricted oncogene expression.<sup>96</sup> In addition, an increased MDSC frequency was detected in the blood of patients with different types of cancers.<sup>97,98</sup> In mice and humans, MDSCs from tumor bearers induce antigen-specific MHC class I restricted tolerance of CD8<sup>+</sup> T cells and are one of the major suppressors of antitumor immunity.<sup>99</sup>

STAT3 is probably one of the main transcription factors that regulate MDSC function. MDSCs from tumor-bearing mice have markedly increased levels of phosphorylated STAT3 compared with immature myeloid cells from naive mice.<sup>91</sup> Moreover, ablation of STAT3 expression through the use of conditional knockout mice or selective STAT3 inhibitor (JSI-124 that did not affect pSTAT1, pSTAT5 or pSTAT6) markedly reduced the expansion of MDSCs, promoted accumulation of dendritic cells and increased T-cell responses in tumor-bearing mice.<sup>85,90,91</sup> Then, activated STAT3 has been proposed to be the main



**Figure 1.** For figure legend, see page 7.

**Figure 1 (See opposite page).** Effects of STAT3 presence (STAT3<sup>+/+</sup>) or absence (STAT3<sup>-/-</sup>) within immune cells. STAT3 activation leads to the activation of Treg and Th17 cells, the differentiation of M2 macrophages, the accumulation of MDSCs and the absence of functional DCs. STAT3 deletion or inhibition leads to the inhibition of Treg and Th17 cells, the differentiation of MDSCs into DCs, a good antigen presentation to CTLs by macrophages and DCs leading to an anti-tumor immune response.

regulator of MDSC expansion. We have shown in contrast that tumor-derived exosome (TDE)-associated HSP72 triggered STAT3 activation in MDSCs in a TLR2/MyD88-dependent manner through autocrine production of IL-6. This mechanism is also relevant in cancer patients, as TDEs from a human tumor cell line activated human MDSCs and triggered their suppressive function but not MDSC expansion in an HSP72/TLR2-dependent manner.<sup>100</sup> How to explain these discrepancies? It is well known that in myeloid cells, STAT3 signaling drives the expression of Bcl-xL, c-myc, cyclin D1 or survivin, which prevents cell apoptosis, promotes cell proliferation, and prevents differentiation to mature cell types.<sup>14,101</sup> Moreover, in vivo STAT3 ablation or inhibition mediates the differentiation of MDSCs into DCs, leading to the observation of an absence of MDSCs and to the conclusion that STAT3 mediates MDSC expansion. In our hands, tumor cell supernatant triggers two distinct molecular pathways in MDSCs: tumor-derived soluble factors trigger the activation of ERK, which results in the expansion of MDSCs, while TDEs trigger the activation of STAT3 without promoting MDSC expansion.<sup>100</sup> Nevertheless, STAT3 controlled the G-CSF-responsive induction of C/EBP $\beta$  (CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$ ) expression in myeloid progenitor cells.<sup>102</sup> The transcription factor C/EBP $\beta$  was reported to play a crucial role in controlling the differentiation of myeloid precursors to functional MDSCs, with a correlation between C/EBP $\beta$  expression and CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> MDSC accumulation in response to G-CSF.<sup>103,104</sup> Moreover, when C/EBP $\beta$  is deleted in bone-marrow cells they lose the ability to differentiate in vitro into functional MDSCs. It is conceivable that STAT3 can at least partially induce MDSC generation via upregulation of C/EBP $\beta$ .<sup>102</sup>

Finally, recent works have highlighted the importance of signaling pathways downstream of STAT3 that are responsible for MDSC differentiation. As mentioned above for macrophages, MDSCs isolated from mouse tumors displayed activated STAT3 and induced angiogenesis in an in vitro tube formation assay via STAT3-dependent induction of angiogenic factors, including VEGF and bFGF.<sup>75</sup> In MDSCs, STAT3 controls the NADPH

oxidase NOX2 expression leading to the production of ROS responsible for MDSC-induced immune suppression in murine mammary, colon, lung carcinoma, thymoma, sarcoma models and in patients with head and neck cancer.<sup>105</sup> In mice, the myeloid-related protein S100A9, a direct target of STAT3 is responsible for an enhanced MDSC production in EL4 or CT26 tumor-bearing mice. Mice lacking this protein mounted potent antitumor immune responses and rejected implanted tumors an effect reversed by administration of wild-type MDSCs from tumor-bearing mice to S100A9-null mice.<sup>106</sup>

## Conclusion

STAT3 activation within immune cells is responsible for the accumulation and the activation of immunosuppressive cells, such as Treg, Th17 and MDSCs, the differentiation of macrophages toward the M2 phenotype and the absence of functional DCs. On the contrary the deletion or the inhibition of STAT3 in these cells leads to the inhibition of Treg and Th17 cells, the differentiation of MDSC, a good antigen presentation by macrophages and DCs leading to an anti-tumor immune response mediated by CTL activation (Fig. 1). Thus, because STAT3 also regulates genes involved in biological functions of cancer cells, it makes this pathway a promising therapeutic target. Then STAT3 could be inhibited directly with peptides or natural compounds or indirectly by blocking upstream signaling pathways such as IL-6 and JAK2 pathways (for review, see ref. 107).

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

C.R. was supported by Ligue contre le cancer comité Grand-Est, F.V. by fellowships from Ligue contre le cancer, H.B. by fellowships from the Conseil Régional Bourgogne/INSERM and F.G. by Fondation ARC, Fondation pour la recherche Médicale, INCA, Ligue contre le Cancer.

## References

1. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:454-65; PMID:17525754; <http://dx.doi.org/10.1038/nri2093>
2. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000; 19:2548-56; PMID:10851053; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203551>
3. Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 2005; 307:269-73; PMID:15653507; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1105166>
4. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:503-29; PMID:15032587; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.091003.090312>
5. Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:593-605; PMID:16056253; <http://dx.doi.org/10.1038/nri1667>
6. Sun S, Steinberg BM. PTEN is a negative regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells. *J Gen Virol* 2002; 83:1651-8; PMID:12075083.
7. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signaling. *Nature* 2001; 409:349-54; PMID:11201744; <http://dx.doi.org/10.1038/35053086>
8. Migone TS, Cacalano NA, Taylor N, Yi T, Waldmann TA, Johnston JA. Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3845-50; PMID:9520455; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.7.3845>
9. Schaper F, Gendo C, Eck M, Schmitz J, Grimm C, Anhof D, et al. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 1998; 335:557-65; PMID:9794795.



10. Krasilnikov M, Ivanov VN, Dong J, Ronai Z. ERK and PI3K negatively regulate STAT-transcriptional activities in human melanoma cells: implications towards sensitization to apoptosis. *Oncogene* 2003; 22:4092-101; PMID:12821943; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206598>
11. Zhou J, Wulfschlegel J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:16158-63; PMID:17911267; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702596104>
12. Daino H, Matsumura I, Takada K, Odajima J, Tanaka H, Ueda S, et al. Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells. *Blood* 2000; 95:2577-85; PMID:10753837.
13. Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19:2468-73; PMID:10851045; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203476>
14. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:798-809; PMID:19851315; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2734>
15. Darnell JE. Validating Stat3 in cancer therapy. *Nat Med* 2005; 11:595-6; PMID:15937466; <http://dx.doi.org/10.1038/nm0605-595>
16. Bollrath J, Pesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; 15:91-102; PMID:19185844; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.002>
17. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15:103-13; PMID:19185845; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.001>
18. Aggarwal BB, Kunnumakara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, et al. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171:59-76; PMID:19723038; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04911.x>
19. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-70; PMID:21436444; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203486>
20. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011; 480:480-9; PMID:22193102; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10673>
21. Shiku H. Importance of CD4+ helper T-cells in antitumor immunity. *Int J Hematol* 2003; 77:435-8; PMID:12841380; <http://dx.doi.org/10.1007/BF02986610>
22. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313:1960-4; PMID:17008531; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1129139>
23. Marrogi AJ, Munshi A, Merogi AJ, Ohadike Y, El-Habashi A, Marrogi OL, et al. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 74:492-501; PMID:9355970; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19971021\)74:5<492::AID-IJC>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19971021)74:5<492::AID-IJC>3.0.CO;2-Z)
24. Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y, et al. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94:275-80; PMID:16421594; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6602934>
25. Tüting T, Storkus WJ, Lotze MT. Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer. *J Mol Med (Berl)* 1997; 75:478-91; PMID:9253711; <http://dx.doi.org/10.1007/s001090050133>
26. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54:721-8; PMID:16010587; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-004-0653-2>
27. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, 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* 2011; 71:1263-71; PMID:21303976; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>
28. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100:655-69; PMID:10761931; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80702-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80702-3)
29. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89:587-96; PMID:9160750; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80240-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80240-8)
30. Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Mizoguchi I, Fukai F, Takeda K, et al. STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J Immunol* 2008; 180:2903-11; PMID:18292512.
31. Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:15047-52; PMID:14657353; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2536517100>
32. Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 2008; 41:87-102; PMID:18172584; <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-007-8014-9>
33. van den Berg WB, Miossec P. IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5:549-53; PMID:19798029; <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2009.179>
34. Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, Peng G. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol* 2010; 184:1630-41; PMID:20026736; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0902813>
35. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126:1121-33; PMID:16990136; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
36. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 2007; 179:4313-7; PMID:17878325.
37. Nishihara M, Ogura H, Ueda N, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Tsuji F, et al. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol* 2007; 19:695-702; PMID:17493959; <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxm045>
38. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8:967-74; PMID:17581537; <http://dx.doi.org/10.1038/ni1488>
39. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007; 282:9358-63; PMID:17277312; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C600321200>
40. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26:371-81; PMID:17363300; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009>
41. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008; 28:29-39; PMID:18164222; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.016>
42. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Végran F, Hichami A, et al. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 2012; 36:362-73; PMID:22406269; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.019>
43. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010; 467:967-71; PMID:20962846; <http://dx.doi.org/10.1038/nature09447>
44. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101:455-8; PMID:10850488; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80856-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80856-9)
45. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:389-400; PMID:12093005.
46. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198:1875-86; PMID:14676299; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20030152>
47. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010; 127:759-67; PMID:20518016.
48. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10:942-9; PMID:15322536; <http://dx.doi.org/10.1038/nm1093>
49. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006; 24:5373-80; PMID:17135638; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2006.05.9584>
50. Perrone G, Ruffini PA, Catalano V, Spino C, Santini D, Muretto P, et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44:1875-82; PMID:18617393; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2008.05.017>
51. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006; 108:1571-9; PMID:16645171; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-02-004747>
52. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007; 445:766-70; PMID:17220876; <http://dx.doi.org/10.1038/nature05479>
53. Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2009; 15:114-23; PMID:19185846; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.018>
54. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 2009; 326:986-91; PMID:19797626; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1172702>

55. Wuest TY, Willette-Brown J, Durum SK, Hurwitz AA. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2008; 84:973-80; PMID:18653463; <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1107778>
56. Huber M, Steinwald V, Guralnik A, Brüstle A, Kleemann P, Rosenplänter C, et al. IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int Immunol* 2008; 20:223-34; PMID:18156621; <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxm139>
57. Xu L, Kitani A, Stuelten C, McGrady G, Fuss I, Strober W. Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity* 2010; 33:313-25; PMID:20870174; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.001>
58. Laurence A, Amarnath S, Mariotti J, Kim YC, Foley J, Eckhaus M, et al. STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease. *Immunity* 2012; 37:209-22; PMID:22921119; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.027>
59. Kong LY, Wei J, Sharma AK, Barr J, Abou-Ghazal MK, Fokt I, et al. A novel phosphorylated STAT3 inhibitor enhances T cell cytotoxicity against melanoma through inhibition of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:1023-32; PMID:19002459; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-008-0618-y>
60. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev* 2008; 222:162-79; PMID:18364001; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00602.x>
61. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000; 164:6166-73; PMID:10843666
62. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13:453-61; PMID:17981560; <http://dx.doi.org/10.2741/2692>
63. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:71-8; PMID:14708027; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1256>
64. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42:717-27; PMID:16520032; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.003>
65. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; 66:605-12; PMID:16423985; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4005>
66. Jenkins BJ, Grail D, Inglese M, Quilici C, Bozinovski S, Wong P, et al. Imbalanced gp130-dependent signaling in macrophages alters macrophage colony-stimulating factor responsiveness via regulation of c-fms expression. *Mol Cell Biol* 2004; 24:1453-63; PMID:14749363; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.24.4.1453-1463.2004>
67. Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, et al. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 2003; 19:425-36; PMID:14499117; [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00232-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00232-2)
68. Kortylewski M, Kujawski M, Herrmann A, Yang C, Wang L, Liu Y, et al. Toll-like receptor 9 activation of signal transducer and activator of transcription 3 constrains its agonist-based immunotherapy. *Cancer Res* 2009; 69:2497-505; PMID:19258507; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3031>
69. Brayer J, Cheng F, Wang H, Horna P, Vicente-Suarez I, Pinilla-Ibarz J, et al. Enhanced CD8 T cell cross-presentation by macrophages with targeted disruption of STAT3. *Immunol Lett* 2010; 131:126-30; PMID:20346983; <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2010.03.004>
70. Sun Z, Yao Z, Liu S, Tang H, Yan X. An oligonucleotide decoy for Stat3 activates the immune response of macrophages to breast cancer. *Immunobiology* 2006; 211:199-209; PMID:16530087; <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2005.11.004>
71. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* 2008; 216:15-24; PMID:18553315; <http://dx.doi.org/10.1002/path.2370>
72. Fujiwara Y, Komohara Y, Ikeda T, Takeya M. Corosolic acid inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of signal transducer and activator of transcription-3 and nuclear factor-kappa B in tumor cells and tumor-associated macrophages. *Cancer Sci* 2011; 102:206-11; PMID:21073634; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01772.x>
73. Fujiwara Y, Komohara Y, Kudo R, Tsurushima K, Ohnishi K, Ikeda T, et al. Oleoic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3. *Oncol Rep* 2011; 26:1533-7; PMID:21922144
74. Hasita H, Komohara Y, Okabe H, Masuda T, Ohnishi K, Lei XF, et al. Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101:1913-9; PMID:20545696; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01614.x>
75. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2008; 118:3367-77; PMID:18776941; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI35213>
76. Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Pérez-Maceda B, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, et al. Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J Immunol* 2011; 186:2192-200; PMID:21239715; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000475>
77. Hiwatashi K, Tamiya T, Hasegawa E, Fukaya T, Hashimoto M, Kakoi K, et al. Suppression of SOCS3 in macrophages prevents cancer metastasis by modifying macrophage phase and MCP2/CCL8 induction. *Cancer Lett* 2011; 308:172-80; PMID:21624767; <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.04.024>
78. Li Y, Cai L, Wang H, Wu P, Gu W, Chen Y, et al. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene* 2011; 30:3887-99; PMID:21499310; <http://dx.doi.org/10.1038/ncr.2011.112>
79. Burdelya L, Kujawski M, Niu G, Zhong B, Wang T, Zhang S, et al. Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *J Immunol* 2005; 174:3925-31; PMID:15778348
80. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 2004; 10:48-54; PMID:14702634; <http://dx.doi.org/10.1038/nm976>
81. Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol* 2010; 12:1113-25; PMID:20667896; <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/naq082>
82. Crowley M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J Exp Med* 1990; 172:383-6; PMID:1694226; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.172.1.383>
83. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96; PMID:1910679; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.09.040191.001415>
84. Laouar Y, Welte T, Fu XY, Flavell RA. STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* 2003; 19:903-12; PMID:14670306; [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00332-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00332-7)
85. Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 2005; 11:1314-21; PMID:16288283; <http://dx.doi.org/10.1038/nm1325>
86. Iwata-Kajihara T, Sumimoto H, Kawamura N, Ueda R, Takahashi T, Mizuguchi H, et al. Enhanced cancer immunotherapy using STAT3-depleted dendritic cells with high Th1-inducing ability and resistance to cancer cell-derived inhibitory factors. *J Immunol* 2011; 187:27-36; PMID:21632716; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1002067>
87. Herrmann A, Kortylewski M, Kujawski M, Zhang C, Reckamp K, Armstrong B, et al. Targeting Stat3 in the myeloid compartment drastically improves the in vivo antitumor functions of adoptively transferred T cells. *Cancer Res* 2010; 70:7455-64; PMID:20841481; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0736>
88. Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, et al. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004; 173:3844-54; PMID:15356132
89. Yu S, Liu C, Su K, Wang J, Liu Y, Zhang L, et al. Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J Immunol* 2007; 178:6867-75; PMID:17513735
90. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, et al. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol* 2004; 172:464-74; PMID:14688356
91. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebt SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res* 2005; 65:9525-35; PMID:16230418; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0529>
92. Nefedova Y, Cheng P, Gilkes D, Blaskovich M, Beg AA, Sebt SM, et al. Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling. *J Immunol* 2005; 175:4338-46; PMID:16177074
93. Bharadwaj U, Li M, Zhang R, Chen C, Yao Q. Elevated interleukin-6 and G-CSF in human pancreatic cancer cell conditioned medium suppress dendritic cell differentiation and activation. *Cancer Res* 2007; 67:5479-88; PMID:17545630; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3963>
94. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21:11-9; PMID:20018552; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytofr.2009.11.005>
95. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2007; 67:425, author reply 426; PMID:17210725; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3037>
96. Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, et al. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* 2008; 14:408-19; PMID:18977329; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.10.011>
97. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001; 166:678-89; PMID:11123353

98. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:49-59; PMID:18446337; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-008-0523-4>
99. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007; 13:828-35; PMID:17603493; <http://dx.doi.org/10.1038/nm1609>
100. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JB, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 2010; 120:457-71; PMID:20093776.
101. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:162-74; PMID:19197294; <http://dx.doi.org/10.1038/nri2506>
102. Zhang H, Nguyen-Jackson H, Panopoulos AD, Li HS, Murray PJ, Watowich SS. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood* 2010; 116:2462-71; PMID:20581311; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-12-259630>
103. Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* 2010; 32:790-802; PMID:20605485; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.010>
104. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, et al. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* 2006; 7:732-9; PMID:16751774; <http://dx.doi.org/10.1038/ni1354>
105. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2009; 182:5693-701; PMID:19380816; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900092>
106. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* 2008; 205:2235-49; PMID:18809714; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20080132>
107. Mankan AK, Greten FR. Inhibiting signal transducer and activator of transcription 3: rationality and rationale design of inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20:1263-75; PMID:21751940; <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.2011.601739>

### Annexe 3

« Socs3 induction by PPAR $\gamma$  restrains cancer-promoting inflammation »

# Socs3 induction by PPAR $\gamma$ restrains cancer-promoting inflammation

Frédérique Végran,<sup>1,2</sup> Hélène Berger,<sup>1,2</sup> François Ghiringhelli<sup>1,2,3</sup> and Lionel Apetoh<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM; U866; Dijon, France; <sup>2</sup>Université de Bourgogne; Dijon, France; <sup>3</sup>Centre Georges François Leclerc; Dijon, France

The presence of proinflammatory cytokines in the tumor microenvironment can support further growth of established cancers. Docosahexaenoic acid (DHA), a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) ligand, has been shown to suppress inflammation and limit tumor progression in vivo. Are the anticancer properties of DHA relying on its ability to prevent inflammation? If so, what are the molecular links between the anti-inflammatory properties of DHA and its anticancer effects?

DHA is an n-3 polyunsaturated fatty acid mainly found in fish oil that was shown to contribute to inflammation resolution by preventing the release of proinflammatory mediators in vivo.<sup>1</sup> DHA has also been associated with health benefits in chronic inflammatory diseases such as cancer. However, the molecular links between the anti-inflammatory effects of DHA and its clinical activity remain elusive. In a cancer setting, the existence of an inflammatory milieu within the microenvironment of established cancers is known to further support tumor cell survival and neoangiogenesis.<sup>2</sup> Interleukin-17-producing CD4 T cells (Th17 cells) have been shown to trigger inflammatory responses and tissue inflammation in vivo. We and others have shown that Th17 cells can support cancer progression.<sup>3-5</sup> We also found that IL-17a secretion from CD4 T cells could compromise the efficacy of anticancer chemotherapies.<sup>6</sup> We have thus explored whether DHA could prevent the cancer-promoting activity of Th17 cells.

We first tested in vitro the effect of DHA on Th17 cell generation from naive mouse CD4 T cells. For this, differentiation of naive T cells was performed in absence of antigen-presenting cells

to investigate the cell-intrinsic effects of DHA on CD4 T cells. Addition of DHA markedly reduced mouse and human Th17 cell differentiation as assessed by dampened IL-17 secretion. Accordingly, naive CD4 T cells obtained from mice under a DHA-enriched diet had reduced ability to differentiate into Th17 cells. We have uncovered the molecular sequence of events accounting for the ability of DHA to prevent Th17 cell differentiation. We found that DHA interfered with the signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) signaling pathway in developing Th17 cells.<sup>7</sup> Under Th17-skewing conditions, DHA first activates PPAR $\gamma$ , which binds to the suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3) promoter and favors the expression of SOCS3, which eventually prevents Stat3 phosphorylation and *Il17* gene transcription (Fig. 1).<sup>7</sup> Finally, in the mouse B16 melanoma and the 4T1 mammary adenocarcinoma tumor models, we found that the anticancer effect of a dietary DHA intake was dependent on IL-17 secretion from CD4 T cells, thereby establishing a link between the ability of DHA to inhibit the secretion of proinflammatory IL-17 and its in vivo anticancer effects.

Dietary supplementation of DHA has been shown to alleviate the severity of intestinal inflammation in experimental models of colitis and in inflammatory bowel disease in humans. Accordingly, olive oil supplemented with fish oil rich in DHA also exhibited a therapeutic effect in the DSS-induced colitis model through the reduction of inflammation. The anti-inflammatory effects of DHA have also been illustrated in experimental autoimmune encephalomyelitis, where mice under a DHA-enriched diet featured decreased

autoimmunity symptoms. While the crucial role of Th17 cells in promoting tissue inflammation and autoimmunity has been documented in the aforementioned autoimmune disorders, whether the beneficial effects of DHA in vivo were attributable to a direct action of DHA on differentiating Th17 cells has remained unclear. Our study has shown that DHA directly suppresses mouse and human Th17 cell differentiation. Not only do these results extend DHA anti-inflammatory properties to a cancer setting, but they also suggest that DHA may suppress inflammation, at least in part, by directly preventing the induction of pathogenic Th17 cells.

Activation of PPAR $\gamma$  has been shown to reduce inflammation and the PPAR $\gamma$  agonist troglitazone has been clinically used as an anti-inflammatory drug in diabetes. Activation of PPAR $\gamma$  has been associated with reduced inflammation. PPAR $\gamma$  ligands such as pioglitazone are currently used to manage insulin resistance but the molecular mechanisms involved remain elusive. Some studies have even proposed that PPAR $\gamma$  ligands might act independently of PPAR $\gamma$  activation. In this regard, given that Th17 cells have been proposed to contribute to diabetes development, the recent identification of the ability of PPAR $\gamma$  ligands to suppress Th17 cell induction possibly provides a mechanistic explanation of the anti-inflammatory activity of Troglitazone in humans.<sup>7,8</sup> However, Troglitazone hepatotoxicity has limited its clinical use. In this regard, our observations suggesting that DHA, a nutrient relatively devoid of toxicity, mirrors the effects of PPAR $\gamma$  activation on Th17 cells might represent an attractive alternative approach for treatment of Th17-related diseases.

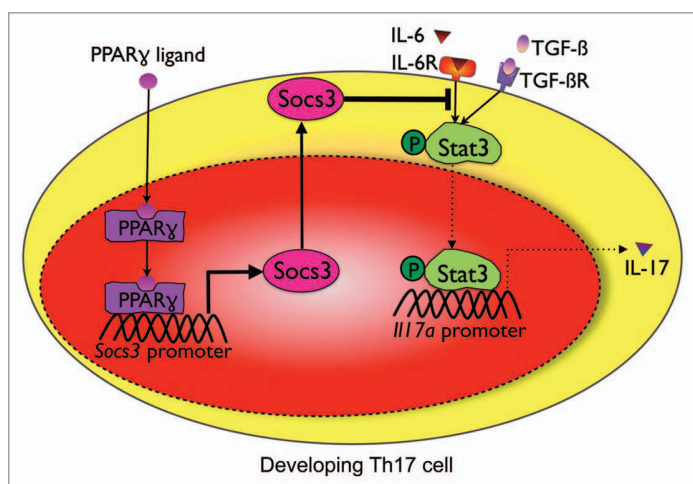
\*Correspondence to: Lionel Apetoh; Email: lionel.apetoh@inserm.fr

Submitted: 06/10/13; Accepted: 06/11/13

<http://dx.doi.org/10.4161/cc.25370>

Comment on: Berger H, et al. Cancer Res 2013; 73:3578-90; PMID:23619236; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4018>





**Figure 1.** PPAR $\gamma$ -induced SOCS3 expression represses Th17 cell differentiation. Initiation of Th17 cell differentiation with TGF- $\beta$  and IL-6 leads to phosphorylation of Stat3. Phosphorylated Stat3 binds to the Il17a promoter and favors IL-17 secretion. However, in the presence of a ligand of PPAR $\gamma$  such as Docosahexaenoic acid, PPAR $\gamma$  binds to and transactivates the Socs3 promoter, thereby driving Socs3 expression. Socs3 subsequently prevents the phosphorylation of Stat3, resulting in decreased IL-17 secretion from developing Th17 cells.

Despite its proinflammatory activity, IL-17 exerts contrasting effects on cancer cell growth depending on the cancer cell type. In humans, IL-17 was associated with poor prognosis in colorectal, lung

and hepatocellular cancers. Conversely, the presence of intratumor IL-17 is a good prognostic factor for gastric, ovarian and prostate cancer. While the molecular mechanisms underlying these

discrepancies require further investigations, these observations suggest that, in vivo, downregulation of IL-17 levels using DHA will not be beneficial for all cancer types. We thus speculate that the use of DHA for the treatment of established malignancies should be restricted to cancers where IL-17 is detrimental.

#### References

1. Wall R, et al. *Nutr Rev* 2010; 68:280-9; PMID:20500789; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>
2. Mantovani A, et al. *Nature* 2008; 454:436-44; PMID:18650914; <http://dx.doi.org/10.1038/nature07205>
3. Chalmin F, et al. *Immunity* 2012; 36:362-73; PMID:22406269; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.019>
4. Wang L, et al. *J Exp Med* 2009; 206:1457-64; PMID:19564351; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20090207>
5. Tosolini M, et al. *Cancer Res* 2011; 71:1263-71; PMID:21303976; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>
6. Bruchard M, et al. *Nat Med* 2013; 19:57-64; PMID:23202296; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2999>
7. Berger H, et al. *Cancer Res* 2013; 73:3578-90; PMID:23619236; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4018>
8. Klotz L, et al. *J Exp Med* 2009; 206:2079-89; PMID:19737866; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20082771v>

Annexe 4 : liste des autres publications et des communications présentées au cours de la thèse

✓ Publications

Derangere, V., Chevriaux, A., Courtaut, F., Bruchard, M., Berger, H., Chalmin, F., Causse, S.Z., Limagne, E., Vegran, F., Ladoire, S., *et al.* (2014). Liver X receptor beta activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells. *Cell death and differentiation* **21**, 1914-1924.

Bugaut, H., Bruchard, M., Berger, H., Derangere, V., Odoul, L., Euvrard, R., Ladoire, S., Chalmin, F., Vegran, F., Rebe, C., *et al.* (2013). Bleomycin exerts ambivalent antitumor immune effect by triggering both immunogenic cell death and proliferation of regulatory T cells. *PLoS One* **8**, e65181.

✓ Présentations issues des travaux de thèse

**22-23 octobre 2014** : 18ème édition des Journées Jeunes Chercheurs en cancérologie de la fondation ARC - Paris, Cité Internationale Universitaire de Paris - « TFh et cancer : l'immunité recrute » (poster).

**27-30 juin 2013** : 13ème meeting annuel de la Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS 2013) - Boston, Massachussets, Etats-Unis - « Transactivation of Socs3 by PPAR $\gamma$  Prevents Th17-driven Cancer Growth » (communication orale).

**13-15 février 2013** : 1er symposium international du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), « Transactivation of SOCS3 by PPAR $\gamma$  prevents Th17-driven inflammation and cancer growth » (poster).

**6-7 septembre 2012** : 18ème Forum des Jeunes Chercheurs - Besançon, « L'acide docosahexaénoïque réprime la différenciation lymphocytaire Th17 et la progression tumorale en activant le facteur de transcription PPAR $\gamma$  » (communication orale).

**8-10 novembre 2011** : Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie (SFI) - Montpellier, « Docosahexaenoic acid inhibits Th17 cell differentiation and tumor growth in vivo » (poster).