

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

INSERM U866

THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Discipline : Sciences Vie  
Spécialité : Biologie Cellulaire

Par

Mélanie Bruchard

Le 17 Octobre 2013

Etude de NLRP3 dans les cellules myéloïdes  
immunosuppressives et les lymphocytes T CD4 dans  
un contexte de cancer.

Directeur de thèse  
François Ghiringhelli

**Membres du jury :**

Pr Eric TARTOUR	rapporteur
Pr Claude LECLERC	rapporteur
Dr Bernard VANHOVE	rapporteur
Dr Virginie PETRILLI	examineur
Dr Grégoire MIGNOT	co-encadrant de thèse
Pr François GHIRINGHELLI	directeur de thèse

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

INSERM U866

THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Discipline : Sciences Vie  
Spécialité : Biologie Cellulaire

Par

Mélanie Bruchard

Le 17 Octobre 2013

Etude de NLRP3 dans les cellules myéloïdes  
immunosuppressives et les lymphocytes T  
CD4 dans un contexte de cancer.

1

---

Directeur de thèse  
François Ghiringhelli

**Membres du jury :**

Pr Eric TARTOUR	rapporteur
Pr Claude LECLERC	rapporteur
Dr Bernard VANHOVE	rapporteur
Dr Virginie PETRILLI	examineur
Dr Grégoire MIGNOT	co-encadrant de thèse
Pr François GHIRINGHELLI	directeur de thèse

## Remerciement

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai effectué pendant ma thèse.

Merci au Professeur Eric Tartour, au Professeur Claude Leclerc et au Docteur Bernard Vanhove d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et au Docteur Virginie Petrilli d'être mon examinatrice, j'ose espérer que vous trouverez à ce travail quelques valeurs.

Mon plus grand et plus profond merci va à François. Merci de m'avoir tant appris pendant ces quatre années, tu as pris le temps de m'inculquer ta démarche et ton raisonnement scientifique et j'espère que tu pourras être fier de la suite de mon parcours. Tu as toujours gardé patience malgré mon caractère affirmé et je garde en mémoire certaines conversations, drôles ou sérieuses, que nous avons eu ensemble. Merci pour tout!

Merci ensuite à tout le reste de l'équipe Ghiringhelli, de celle des débuts, avec Fanny, Cédric, Grégoire et Angélique, mais aussi à tous les nouveaux membres venus enrichir et agrandir cette équipe petit à petit. Merci à Fanny pour ta gentillesse et ton calme. Merci à Cédric, pour tes conseils techniques toujours précis et complets mais surtout pour ton humour au sarcasme acéré qui m'a beaucoup fait rire tout au long de ces quatre années ! Merci à Grégoire, pour m'avoir appris tes multiples compétences techniques et pour tes imitations variées mais toujours réussies. Angélique, ta disponibilité et ton calme en toutes circonstances (ou presque !) me resteront longtemps en mémoire.

Valentin, ton humour et ta bonne humeur me manqueront à Amsterdam mais je me rappellerais nos mauvaises blagues (une biche !!) et écouterais un peu d'Iron Maiden pour y remédier. Bon courage pour la fin de thèse et tout le meilleur à toi et à Julie. Hélène et Frédérique, duo de choc s'il en est, à nous trois, la diff T n'aura pas résistée ! Merci à vous deux pour votre gentillesse et pour nous supporter tous lors des poses cafés toujours drôles mais parfois plus longues que prévues. A Fred, je croise les doigts pour qu'un poste de CR arrive rapidement et à Hélène, bon courage pour la suite et la fin de thèse ! Lionel, merci pour ces conversations et ces conseils sur la recherche « à l'extérieur », j'espère que mon parcours sera aussi brillant que le tien. Merci ensuite à tous les autres membres de l'équipe, Emeric, Hélène, Pierre, Marie, Marion, Flavie, Alexia, Magalie, Aurélie et Romain ainsi qu'à Aziz, Dominique, Mickael et Monsieur Martin. Et bien entendu merci aussi à toi Christel, avec ton accent du sud et ta bonne humeur, l'été dure un peu plus longtemps ! Bon courage à tous pour la suite !

Jess, nous nous suivons depuis bientôt 10 ans maintenant et notre séparation ne va pas être si simple. Nous avons évolué ensemble, suivant chacune notre propre chemin mais toujours avec l'appui de l'autre, présente l'une pour l'autre dans la vie de tous les jours mais aussi dans les grands moments. J'ai pris l'habitude de ton exubérance quotidienne et la vie sera plus calme sans toi ! Je serais toujours là pour toi et maintenant aussi pour Luca.

Une pensée également à de nombreux membres de l'U866, ils se reconnaîtront, avec une attention particulière pour Myriam, éternelle bavarde, je te souhaite tout le meilleur pour la suite ! Un grand merci à Arlette pour tous ces millions de T naïfs triés, toujours dans la bonne humeur malgré les horaires tardifs auxquels je t'ai soumise. Sans toi le deuxième papier n'aurait pas pu être réalisé !

Merci ensuite au groupe du midi, Mika, Mag, Vivi, Momo, Cédric et Debbie, ces poses quotidiennes en votre compagnie m'ont permis de sortir la tête des manip parfois très prenantes et surtout de décompresser en bonne compagnie. A tous ces docteurs ou futurs docteurs, je vous souhaite tout le meilleur et une carrière à la hauteur de votre ambition.

Un grand merci à tous mes amis, avec une mention spéciale au groupe des 12 (je gagne). Vous avez toujours écouté avec intérêt mes monologues concernant la recherche, je ne sais pas si vous avez toujours tout compris mais vous avez en tout cas bien fait semblant ! Merci à Tarik et Julie pour tous ces bons moments passés ensemble, vous êtes sûres qu'un post-doc à Amsterdam, ça ne vous tente pas ?

Il est maintenant temps de remercier la famille, qui m'a toujours soutenu et encouragé. Merci à mes parents, vous avez toujours cru en moi, me poussant à aller plus loin et ne jamais abandonner même pendant mes périodes de doutes. Merci fréro, tu es, je pense, mon premier supporter et te donner une raison d'être fier de moi m'a certainement poussé à donner le meilleur. J'espère avoir un jour le bonheur de fonder une famille aussi belle que la tienne !

---

3

Merci également à Annie et Denis, beaux parents en or, pour m'avoir accepté dans la famille si vite et ce, malgré mes débuts fracassants ! Merci pour votre gentillesse et pour tous ces bons vins !

Enfin, merci à mon cher mari. Tu m'as supporté et réconforté pendant mes périodes de doutes, tu n'as jamais pesté contre mon emploi du temps parfois très chargé. Tu m'as encouragé à suivre ma voie même si cela va nous séparer pendant deux ans. Je suis sûre que notre amour n'en ressortira que plus fort. Ton calme, ta gentillesse mais aussi ton humour et ta patience font de toi le meilleur des maris (en tout cas, le meilleur que j'ai eu pour l'instant !!). En bref, je t'aime chaton !!

« Alors je cherche et je trouverais... »

Partenaire particulier

« La science est un jeu dont la règle du jeu consiste à trouver quelle est la règle du jeu. » François Cavanna

## Résumé

L'inflammasome NLRP3 (NOD like receptor pyd containing 3) est un complexe multiprotéique responsable notamment de la production d'IL-1 $\beta$  (interleukine 1 $\beta$ ), une cytokine inflammatoire. Les effets délétères de l'inflammasome NLRP3 ont été démontrés dans de nombreuses maladies dont le cancer. Ce travail se concentre sur les effets de NLRP3 dans le contexte du cancer.

Dans un premier projet, j'ai étudié l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC (myeloid derived suppressor cells) après un traitement par chimiothérapie. Deux chimiothérapies, le 5-Fluorouracile et la Gemcitabine, sont capables d'éliminer de façon spécifique les MDSC, population de cellules immunosuppressives dont la taille augmente en cas de cancer. L'élimination de cette population immunosuppressive restaure l'immunité anti-tumorale pendant un temps mais un autre type d'immunosuppression est rapidement mis en place grâce à l'IL-1 $\beta$  produite par les MDSC avant leur élimination. J'ai découvert que le 5-Fluorouracile et la Gemcitabine activaient l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC. En effet, le 5-Fluorouracile et la Gemcitabine provoquent la perméabilisation du lysosome des MDSC, permettant la sortie de la cathepsine B, protéine lysosomale, dans le cytoplasme où elle interagit directement avec NLRP3. Cette interaction active l'inflammasome NLRP3 et la production d'IL-1 $\beta$ . Cette IL-1 $\beta$  est responsable du développement d'une nouvelle population immunosuppressive, les Th17.

J'ai ensuite étudié le rôle de NLRP3 dans la différenciation des lymphocytes T CD4 Th2. Dans ces cellules, le rôle de NLRP3 s'effectue indépendamment du reste du complexe multiprotéique qui forme l'inflammasome. Après avoir été induit par la cascade de signalisation de l'IL-2, NLRP3 interagit avec IRF4 (interferon regulatory factor) et agit comme un facteur de transcription sur le promoteur du gène de l'IL-4. L'absence de NLRP3 a pour conséquence une production moins importante d'IL-4 par les Th2 qui sont alors moins fonctionnels.

Mots clés: Cancer, chimiothérapie, NLRP3, Th17, différenciation Th2

## Abstract

The inflammasome NLRP3 (NOD like receptor pyd containing 3) is a multiprotein complex notably responsible for IL-1 $\beta$  (interleukine-1 $\beta$ ) production, an inflammatory cytokine. Negative effects have been observed in various diseases including cancer. My thesis focuses on the effects of NLRP3 in cancer.

In my first project, I studied the NLRP3 inflammasome activation in MDSC (myeloid derived suppressor cells) after a chemotherapy treatment. Two chemotherapies, 5-Fluorouracil and Gemcitabine, are selectively able to kill MDSC, an immunosuppressive population growing during cancer evolution. MDSC's death restores anti-tumor immunity for a while but another immunosuppressive population is established by MDSC produced IL-1 $\beta$  before their disappearance. I discovered that 5-Fluorouracil and Gemcitabine trigger NLRP3 inflammasome activation in MDSC. 5-Fluorouracil and Gemcitabine induce lysosomal permeabilisation, allowing for Cathepsin B release into the cytoplasm where it directly interacts with NLRP3. That interaction activates the inflammasome and induces IL-1 $\beta$  production which is responsible for the development of another immunosuppressive population, called Th17 cells.

5

---

I then studied the role of NLRP3 during Th2 differentiation. Here, NLRP3 actions are done independently of the other inflammasome forming proteins. After being induced by IL-2 signalization pathway, NLRP3 interacts with IRF4 (interferon regulatory factor 4) and acts as a transcription factor on the IL-4 promoter gene. Lack of NLRP3 leads to a smaller IL-4 production by Th2 cells which are consequently less functional.

Keywords: Cancer, chemotherapy, NLRP3, Th17, Th2 differentiation

## Table des matières

Remerciement.....	2
Résumé.....	4
Abstract.....	5
Table des matières .....	6
Liste des tableaux :.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des annexes .....	10
Abréviations .....	11
Introduction .....	13
A. L'inflammation .....	14
1. Prélude .....	14
a. La phase d'initiation : la phase vasculaire.....	15
b. La phase d'amplification : le recrutement des cellules inflammatoires .....	16
c. La phase de résolution .....	17
d. L'inflammation chronique.....	17
2. Activation de l'inflammation par les signaux de danger.....	18
a. Les signaux de dangers exogènes .....	19
b. Les signaux de dangers endogènes.....	19
c. Les PRR .....	20
3. L'inflammasome.....	22
a. Les NLR : Structure et fonctions.....	22
b. L'inflammasome NLRP3 .....	27
B. Cancer et immunosuppression .....	34
1. Généralité.....	34
2. Les traitements .....	35
a. La chirurgie.....	35
b. La radiothérapie.....	35
c. La chimiothérapie .....	36
d. L'immunothérapie.....	38
e. L'hormonothérapie .....	39
f. La vaccination.....	39
3. Les 10 caractéristiques des cellules cancéreuses .....	40

4.	La théorie de l'immunosurveillance des tumeurs.....	42
5.	L'inflammation dans le cancer .....	44
a.	Les proto-oncogènes.....	44
b.	STAT3.....	45
c.	Les espèces oxygénées.....	45
d.	NF-κB.....	46
e.	Les autres molécules liant inflammation et cancer .....	47
6.	Echappement tumoral et immunosuppression .....	48
a.	Les mécanismes d'échappement .....	48
b.	Les cellules immunosuppressives .....	49
c.	Les cytokines à potentiel immunosuppressif.....	57
C.	Le système immunitaire adaptatif .....	62
1.	Généralités .....	62
2.	Les lymphocytes B.....	64
3.	Les lymphocytes T CD8.....	64
4.	Les sous-types de lymphocytes T CD4 .....	65
a.	Les Th1 .....	67
b.	Les Th2 .....	69
c.	Les Th17 .....	71
d.	Les iTreg .....	73
e.	Les Tfh .....	75
f.	Les Th9 .....	77
D.	Les objectifs du travail de thèse.....	80
	Résultats.....	81
A.	Article 1 .....	82
B.	Article 2 .....	97
	Discussion.....	124
A.	Importance de l'activation de l'inflammasome NLRP3 après un traitement par chimiothérapie.....	125
B.	Rôle de NLRP3 dans la différenciation Th2 .....	130
C.	Discussion générale.....	134
	Conclusion et perspectives .....	136
	Bibliographie .....	140
	Annexes.....	155



**Liste des tableaux :**

Tableau 1 : Effets négatifs et positifs des principales cellules immunosuppressives.

## Liste des figures.

Figure 1 : La réaction inflammatoire.

Figure 2 : Structure typique des TLR.

Figure 3 : Structure des NLR.

Figure 4 : Composition de l'inflammasome NLRP3.

Figure 5 : Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3.

Figure 6 : Voies de signalisation de l'IL-1 $\beta$ .

Figure 7 : Voies de signalisation du TNF- $\alpha$ .

Figure 8 : Voie de signalisation de l'IL-6.

Figure 9 : Impact du cancer sur la population française.

Figure 10 : Mode d'action du 5-FU.

Figure 11 : Mode d'action de la Gemcitabine.

Figure 12 : Les dix caractéristiques des cellules cancéreuses.

Figure 13 : Mécanismes de l'immunosurveillance

Figure 14 : Impact de l'environnement cytokinique sur la polarisation Th17 et conséquences sur les cellules cancéreuses.

Figure 15 : Les divers rôles pro-tumoraux de l'IL-6.

Figure 16 : Effets dose-dépendants de l'IL-1 $\beta$ .

Figure 17 : La différenciation lymphocytaire.

Figure 18 : Les différents sous-types de lymphocytes T CD4.

Figure 19 : La différenciation Th1.

Figure 20 : La différenciation Th2.

Figure 21 : La différenciation Th17.

Figure 22 : La différenciation iTreg.

Figure 23 : La différenciation Tfh.

Figure 24 : La différenciation Th9.

Figure 25 : Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC après traitement par 5-FU ou Gem.

Figure 26 : Rôle de NLRP3 dans la différenciation Th2.

## Liste des annexes

Annexe 1 : article «5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. »

Annexe 2 : Données supplémentaires de l'article « Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. »

Annexe 3 : Données supplémentaires de l'article « NLRP3 protein is a transcriptional regulator of Th2 differentiation»

Annexe 4: Liste des autres publications

## Abréviations

ADCC : Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity	DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern
ADN : Acide Désoxy-riboNucléique	DC : Cellule Dendritique
ADP : Adénosine Di-Phosphate	DISC : Death-Inducing Signaling Complex
APAF : Apoptotic Protease-Activating Factor	DNMT1 : DNA (cytosine-5)-methyltransferase
ARN : Acide RiboNucléique	EAE : Experimental Auto-immune Encephalomyelitis
ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD	FoxP3 : Forkhead box P3
ATP : Adenosine Tri-Phosphate	GATA3 : GAGA binding protein 3
Batf: Basic leudine zipper transcriptional factor ATF-like	GBP5 : Guanylate-Binding Protein 5
Bax : Bcl2 Associated X protein	Gfi-1 : Growth factor independent-1
BCG : Bacille de Calmette-Guérin	GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Bcl : B cell lymphoma	HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2
BCR : B Cell Receptor	HIF : Hypoxia-Inducible Factor
BIR : Baculovirus Inhibitor Repeat	HMGB : High Mobility Group Box
CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain	HSP : Heat Shock Protein
CD : Cluster de Différenciation	IAP1 : Inhibitor of Apoptosis
CIITA : Class II TransActivator	IBD : Inflammatory Bowel Disease
CLR : C-type Lectin Receptors	ICOS : Inducible COStimulator
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	IFN- $\gamma$ : InterFéroN gamma
COX2 : CycloOxygénase 2	IG : ImmunoGlobulines
CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène	IL : InterLeukine
CRD : Carbohydrate Recognition Domain	iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen	IRF : Interferon Regulatory Factor
	JAK : JAnus Kinase

LGP2 : Laboratory of Genetics and Physiology 2

LPS : LipoPolySaccharide

LRR : Leucine Rich Repeat

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MAVS : Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein

MDA-5 : Melanoma Differentiation-Associated gene

MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cell

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

NAIP : Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein

NFATc2 : Nuclear Factor of Activated T cell 2

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

NK : Natural Killer

NLR : Nod Like Receptor

O.R.L : *Oto-Rhino-Laryngologiques*

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PD-1 : Programmed cell Death protein 1

PDL-1 : Programmed cell death 1 ligand 1

PGE2 : ProstaGlandine E2

PKR : double-stranded RNA-dependent Protein Kinase

PRR : Pattern Recognition Receptor

PYD : PYrin Domain

RIG-1 : Retinoic acid-Inducible Gene 1

RIP1 : Receptor-Interacting serine/threonine-Protein

RLR : RIG-I-Like receptors

RORγT : RAR-related Orphan Receptors gamma T

ROS : Reactive Oxygen Species

SLPI : Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor

Socs : Suppressor of cytokine signaling

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

SST3 : Système de Sécrétion de Type III

TAP : Transporter associated with Antigen Processing

T-bet : T-box transcription factor TCR

TCR : T Cell Receptor

Tfh : T follicular helper

TGF : Tumor Growth Factor

Th : T helper

TIR : Toll/IL-1 Recepteur

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRADD : Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein

TRAF : Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor

Treg : T régulateurs

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

# Introduction

## A. L'inflammation

### 1. Prélude

L'inflammation est un ensemble de mécanismes de défense mis en place par l'organisme. Ce travail de thèse porte sur l'étude d'une protéine jouant un rôle prépondérant dans l'inflammation, NLRP3. J'ai étudié cette protéine dans deux cellules du système immunitaire, en m'intéressant aux conséquences de son expression et de son activation.

De nombreux agents peuvent déclencher la mise en place d'une inflammation tels que des agents infectieux, des substances étrangères, des agents physiques ou encore des lésions tissulaires post-traumatiques. Les premières observations de réaction inflammatoire ont été faites dès 1600 av J-C par les égyptiens qui avaient décrit le phénomène de rougeur accompagnant un coup ou une plaie. Au premier siècle après J-C, Aulus Cornelius Celsus décrit les quatre symptômes cardinaux de l'inflammation « *Rubor et tumor cum calore et dolore* » c'est-à-dire rougeur et gonflement associés à la chaleur et à la douleur. Lors du second siècle après J-C, Claude Galien ajouta un cinquième symptôme cardinal, le « *functio laesa* » ou la perte de fonction. Ces symptômes correspondent à une augmentation de la vasodilatation et de la perméabilité des vaisseaux facilitant la diapédèse des cellules immunitaires circulantes, majoritairement des macrophages, neutrophiles et monocytes, au niveau du site de l'inflammation. Un gradient chimiotactique guide ces cellules au site de l'infection où elles vont éliminer les pathogènes et produire des cytokines. Ces cytokines vont permettre le recrutement d'un plus grand nombre de cellules immunitaires et vont activer les cellules impliquées dans la réparation tissulaire. L'inflammation se termine une fois la réparation tissulaire achevée.

Une réaction inflammatoire non maîtrisée par l'organisme aura des effets délétères pouvant être graves. Elle peut s'étendre à d'autres parties de l'organisme via la circulation sanguine, être responsable de lésions locales ou généralisées et mener à un choc septique. Une réaction inflammatoire non maîtrisée peut également devenir chronique. La polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la tuberculose ou l'IBD (pour Inflammatory Bowel Disease) qui

regroupe la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse font parties des nombreuses pathologies présentant une inflammation chronique.

a. La phase d'initiation : la phase vasculaire

La phase vasculaire consiste en une réaction locale qui se déclenche immédiatement après la lésion tissulaire. Le tissu lésé libère trois types de signaux. Le premier signal correspond à la sécrétion de peptides bioactifs par les neurones en réponse à la douleur. Le second signal vient de la libération, par les cellules endommagées dans le milieu extracellulaire, de composants intracellulaires tels que les protéines de choc thermique ou le facteur de transcription HMGB1 (High Mobility Group Box) qui vont déclencher la production de cytokines pro-inflammatoires. Le dernier signal provient des bactéries dont certains composants ou produits sont détectés par les TLR (Toll Like Receptor) et les protéines du complément.

De par leur statut de cellules résidentes dans les tissus, les mastocytes et les macrophages vont répondre à ces signaux rapidement. Les mastocytes vont alors sécréter de l'histamine, des eicosanoïdes et des tryptases, responsables de la vasodilatation (causant rougeur et chaleur) et de l'extravasation de fluide (responsable du gonflement). La production de tryptases va également faciliter la diapédèse des leucocytes et le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) et le TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor) relargués par les mastocytes et les macrophages vont recruter et activer les neutrophiles lors de la phase d'amplification. L'histamine favorise l'expression à la surface des cellules endothéliales de la P-sélectine et les cytokines sécrétées par les cellules endommagées induisent l'expression de la L-sélectine mais aussi de ICAM-1 et de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales (Akdis and Blaser, 2003). Les sélectines permettent de ralentir les leucocytes qui sont ensuite arrêtés grâce à l'interaction de ICAM-1 et VCAM-1, sur les cellules endothéliales, avec les intégrines (LFA-1, Mac-1 et VLA-1) présentes sur les leucocytes. Ceux-ci peuvent alors entrer dans le tissu et sont guidés par un gradient d'IL-8 sécrétée par les macrophages jusqu'aux cellules lésées.



b. La phase d'amplification : le recrutement des cellules inflammatoires

Un gradient chimiotactique d'azurocidine est mis en place par la dégranulation des neutrophiles attirés et activés par le TNF- $\alpha$  et les leucotriènes produits pendant la phase d'initiation. Ce gradient permet de guider les monocytes et les macrophages des vaisseaux jusqu'au site de la lésion. Le TNF- $\alpha$  et les chimiokines vont se combiner avec la PGE2 (ProstaGlandine E2) et les défensines produites par les neutrophiles pour recruter les lymphocytes sur le site de la lésion. Les leucotriènes produits par les mastocytes vont attirer les cellules dendritiques. Après avoir été activés par les cellules dendritiques et les macrophages, les lymphocytes vont sécréter des cytokines, comme le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$  (InterFéron gamma) qui vont renforcer l'activation des macrophages (Figure 1).

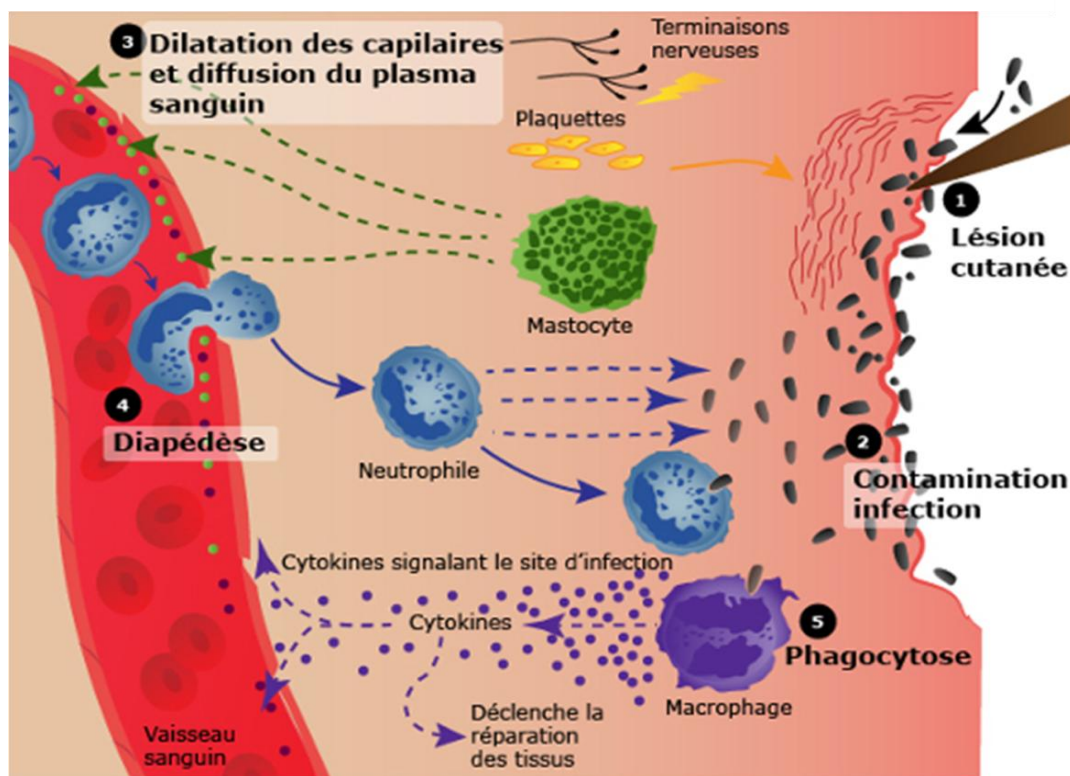


Figure 1 : La réaction inflammatoire.

Après la lésion du tissu, les mastocytes secrètent des molécules responsables de la vasodilatation et de l'extravasation de fluide. Les tryptases produites par les mastocytes facilitent la diapédèse des leucocytes, majoritairement des neutrophiles. Ceux-ci mettent en place un gradient de chimiokines qui permet d'attirer les macrophages et les cellules dendritiques. Une réponse immunitaire complète et efficace est alors en place au lieu de la lésion. D'après (source internet).

### c. La phase de résolution

La phase de résolution débute lorsque l'infection est maîtrisée. La réparation des tissus peut alors commencer. Le basculement dans la phase de résolution est une étape cruciale car la réparation de tissus encore contaminés peut être catastrophique pour l'organisme.

La première étape consiste en la production de SLPI (Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor) par les macrophages. SLPI a des propriétés anti-inflammatoires et des effets favorisant la réparation des tissus. SLPI va se lier avec la pro-granuline, un facteur de croissance épithélial et le protéger de la digestion par des élastases secrétées par les neutrophiles activés. Ensemble, ils vont supprimer l'activation des neutrophiles et promouvoir la croissance de l'épithélium (Zhu et al., 2002). Les neutrophiles présents vont mourir par apoptose et aucun nouveau neutrophile ne va pénétrer dans les tissus endommagés. Les macrophages vont phagocyter les corps apoptotiques des neutrophiles et le TNF- $\alpha$  présent va les induire à produire de l'IL-12 (InterLeukine). Cette IL-12 va à son tour induire les lymphocytes à sécréter de l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$ , qui a précédemment servi à activer les macrophages, va maintenant supprimer leur production de chimiokines (Robson et al., 2001; Tran, Prince, and Owens, 2000). La phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages les stimule à produire de l'IL-10 (Kennedy and DeLeo, 2009) et du TGF- $\beta$  (Huynh, Fadok, and Henson, 2002). Ce TGF- $\beta$ , qui servait à recruter les neutrophiles au début de la phase d'amplification, a maintenant des effets positifs sur la réparation des tissus endommagés. Le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$ , la PGE2 et le TGF- $\beta$  font partie des molécules qui sont pro- ou anti-inflammatoires suivant le contexte et la cinétique.

### d. L'inflammation chronique

Un dérèglement dans la quantité ou dans la cinétique d'arrivée des cellules ou de production des diverses molécules impliquées dans l'inflammation est suffisant pour bloquer la phase de résolution. En l'absence de résolution de l'inflammation, celle-ci devient chronique et peut jouer un rôle négatif, comme observé dans de nombreuses maladies. De nombreux facteurs extérieurs peuvent également mener à une inflammation chronique. Un exemple

fréquemment cité est celui de la tuberculose dans laquelle l'infection persistante induit une inflammation chronique. L'infection n'étant pas maîtrisée, la phase de résolution ne peut s'enclencher. Certaines maladies inflammatoires chroniques sont dues à une exposition répétée à une toxine, qui provoque une lésion des tissus et déclenche une réaction auto-immune. Cette réaction auto-immune peut ensuite perpétuer l'inflammation. La fumée de cigarette en est un exemple bien connu. Chez la souris, elle altère la capacité des macrophages à phagocyter les corps apoptotiques (Phipps et al., 2010), la réponse immunitaire n'est donc pas maîtrisée et l'inflammation perdure. Les tumeurs sont une autre cause d'inflammation chronique car pour progresser et se disséminer, elles ont besoin d'une néoangiogénèse active, que les cellules inflammatoires peuvent déclencher. Les cellules cancéreuses attirent donc les cellules inflammatoires grâce à leur production de chimiokines (Mantovani et al., 2008) et les activent en produisant des protéoglycanes comme la versicane qui se lie à l'hétérodimère TLR2-6 des cellules myéloïdes qui, en conséquence, produisent du TNF- $\alpha$ , connu pour son rôle positif dans l'angiogénèse (Kim et al., 2009). Les MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cell), une population de cellules immunosuppressives qui se multiplie en cas de cancer, prolongent également l'inflammation. Elles suppriment les réponses des lymphocytes T, les empêchant de limiter la quantité de chimiokines produites par les cellules cancéreuses (Vincent et al., 2010). Celles-ci peuvent alors attirer plus de cellules inflammatoires et avoir une néoangiogénèse plus importante.

## 2. Activation de l'inflammation par les signaux de danger

Les signaux de danger, qu'ils soient exogènes ou endogènes activent des récepteurs nommés PRR (Pattern Recognition Receptor) tels que les TLR, les RLR (RIG-I-Like Receptors), les CLR (C-type Lectin Receptors) et les NLR (Nod Like Receptor) présents sur les cellules de l'immunité innée et acquise et provoquent l'initiation de l'inflammation (Takeuchi and Akira, 2010). Un même PRR est souvent capable de reconnaître des signaux de danger endogènes et exogènes.

#### a. Les signaux de dangers exogènes

Les signaux de danger exogènes sont des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ils sont exprimés par des bactéries, des virus, des champignons ou encore des parasites. Le LPS (LipoPolySaccharide), présent à la surface des bactéries gram-, est l'un des PAMP les plus connus et étudiés. Il est reconnu par TLR4. Les virus peuvent être détectés par d'autres TLR qui reconnaissent l'ADN (Acide Désoxy-riboNucléique) ou l'ARN (Acide RiboNucléique) double ou simple brin. (Michallet et al., 2013)

#### b. Les signaux de dangers endogènes

Les signaux de danger endogènes ou DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern) sont des signaux provenant de cellules endommagées ou stressées de l'hôte. Les DAMP sont une famille de molécules intracellulaires dans des conditions physiologiques et qui peuvent être divisées en deux groupes (Kaczmarek, Vandenabeele, and Krysko, 2013).

Le premier groupe consiste en des molécules qui ont des fonctions non inflammatoires dans les cellules vivantes et qui acquièrent des propriétés immunomodulatoires quand elles sont libérées, modifiées, secrétées ou exposées à la surface de la cellule après un stress ou une lésion de la cellule (Kono and Rock, 2008). HMGB1, les HSP (Heat Shock Protein) et l'ATP (Adenosine Tri-Phosphate) font partie de ce groupe.

Dans le second groupe se trouvent les molécules qui possèdent des fonctions de cytokine ou qui peuvent être stockées dans la cellule et sont libérées dans le milieu extracellulaire après la lyse de la cellule où elles contribueront à la réponse inflammatoire (Oppenheim and Yang, 2005). L'IL-1 $\alpha$ , l'IL-33 et l'acide urique en sont des exemples.

## c. Les PRR

### i. Les TLR

La famille des TLR est une des familles de PRR la mieux caractérisée. Elle est capable de détecter des signaux de danger extracellulaires ainsi qu'au sein des endosomes et des lysosomes intracellulaires. Elle est composée de 10 membres chez l'humain et de 13 membres chez la souris. Les TLR sont caractérisés par la présence d'un domaine LRR (Leucine Rich Repeat) extracellulaire et du côté N-terminal, d'une région transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique TIR (Toll/IL-1 Recepteur) (Brown et al., 2011) (Figure 2).

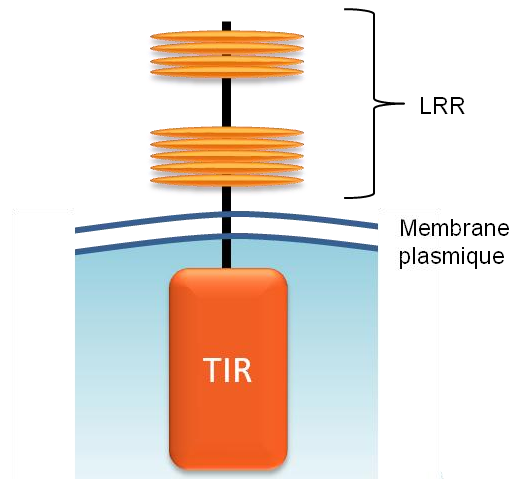


Figure 2 : Structure typique des TLR.

Les TLR sont constitués d'un domaine cytoplasmique TIR, pour Toll/IL-1 récepteur, qui est responsable du déclenchement de la cascade de signalisation, et d'un domaine LRR, qui est soit extra-cellulaire soit dans les endosomes et qui permet la détection des PAMP.

Chaque TLR va réagir à un type de PAMP et de DAMP particulier et il est possible de les séparer en deux sous-familles suivant cette particularité. Les TLR 3, 7, 8 et 9 sont capables de détecter les acides nucléiques sous diverses formes et se trouvent à la surface des endosomes et des lysosomes. Les TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10, (et 11, 12 et 13 chez la souris) reconnaissent les produits bactériens et sont retrouvés à la surface de la cellule. Les TLR sont également capables de former des hétérodimères permettant d'augmenter la variété de ligands reconnus (Takeuchi and Akira, 2010).

## ii. Les CLR

Les CLR sont une famille de 15 récepteurs caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs domaines CRD (Carbohydrate Recognition Domain) et sont soit sous forme soluble soit liés à la membrane, l'un des plus connus est DC-SIGN. Ils reconnaissent principalement des sucres provenant de bactéries, de virus ou de champignons. L'activation des CLR peut soit déclencher la production de cytokines pro-inflammatoires soit moduler la réponse immunitaire mise en place par les TLR (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Certains CLR sont également capables d'influencer la différenciation lymphocytaire T CD4 (Cluster de Différenciation) vers les sous types Th1 (T helper) ou Th17 en induisant ou en refreinant la production de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL6, IL23 et TNF $\alpha$ ) par les cellules dendritiques (Zenaro, Donini, and Dusi, 2009).

## iii. Les RLR

La famille des RLR est composée de RIG-1 (Retinoic acid-Inducible Gene 1), de MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated gene) et de LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology). Du coté N-terminal, ils sont composés de deux domaines CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), au centre, d'un domaine DEAD box helicase/ATPase et d'un domaine régulateur du coté C-terminal. Ils sont situés dans le cytoplasme et reconnaissent l'ARN double brin viral via leur domaine en C-terminal. L'expression des RLR est augmentée lors d'une infection virale ou d'une stimulation de la cellule par un interféron de type 1. L'activation des RLR induit la production d'IFN de type 1, de cytokines et active les caspases 8 et 10. Les trois membres de la famille RLR reconnaissent des ARN de virus différents, prouvant leur complémentarité. RIG-1 et MDA-5 sont fortement exprimés dans les lymphocytes T et il a été montré que la stimulation de lymphocytes T régulateurs par le virus de l'encéphalomyocardite diminuait leurs fonctions inhibitrices de façon dépendante de MDA-5 (Michallet et al., 2013).

#### iv. Les NLR

La famille des NLR est composée de 23 récepteurs cytoplasmiques chez l'humain et 34 chez la souris (Rathinam, Vanaja, and Fitzgerald, 2012). Ils possèdent un domaine central NACHT (d'après les protéines NAIP, CIITA, HET-E et IP-1) et pour la plupart un domaine LRR en C-terminal. La nature de leur domaine en N-terminal permet de les diviser en quatre sous-familles : NLRA, NLRB, NLRC et NLRP. Une fois activés, certains NLR forment un complexe multiprotéique appelé inflammasome. Ce point sera discuté de façon approfondie dans la partie suivante.

### 3. L'inflammasome

#### a. Les NLR : Structure et fonctions

A quelques exceptions près, les NLR sont composés de trois domaines. Un domaine NACHT suivi d'un domaine LRR riche en leucine. Le troisième domaine, situé en N-terminal, permet de classer les NLR en quatre sous-familles (Figure 3).

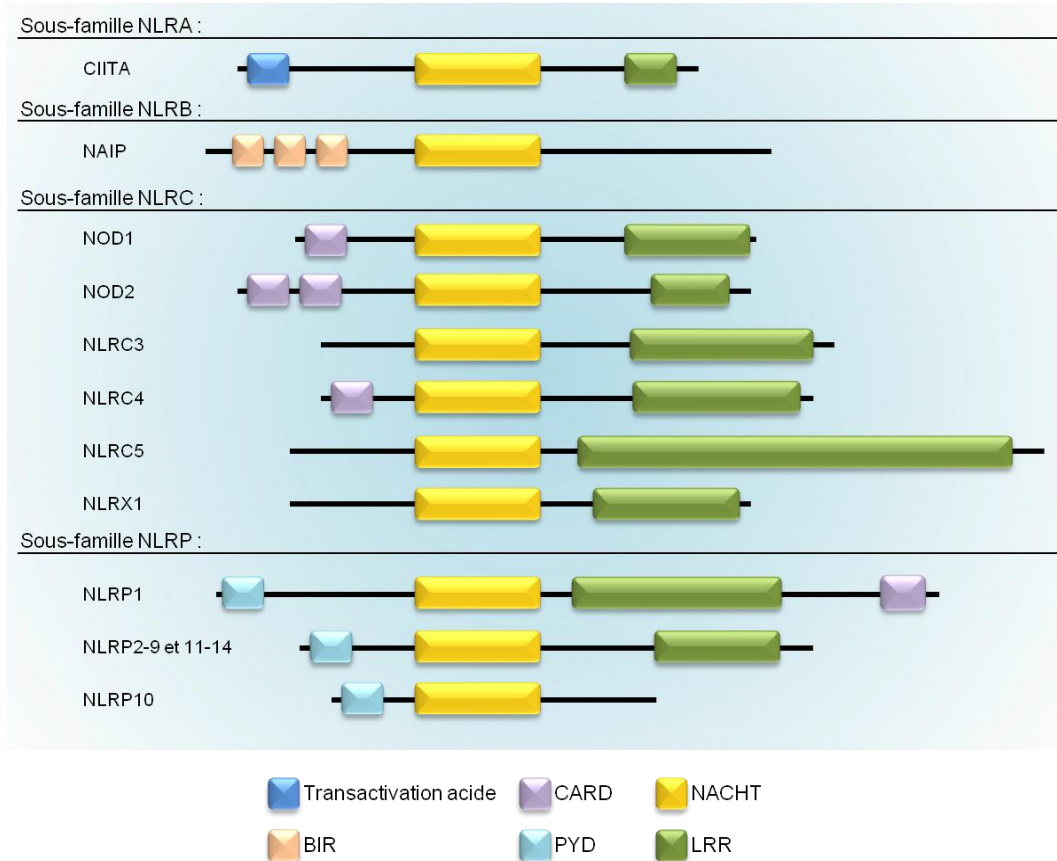


Figure 3: Structure des NLR humains.

Les quatre sous-familles de NLR possèdent en commun le domaine NACHT ainsi que le domaine LRR, à l'exception de NAIP et de NLRP10. La sous-famille NLRA exprime un domaine de transactivation acide alors que la sous-famille NLRB exprime le domaine BIR. Certains NLRC possèdent un domaine CARD en plus de NACHT et de LRR et les NLRP ont tous un domaine PYD. Ces différentes compositions leur permettent une grande variété concernant les ligands reconnus. Adapté de (Kersse et al., 2011)

La sous-famille NLRA possède un domaine de transactivation acide et son unique membre, CIITA (Class II TransActivator) est connu pour son rôle essentiel dans la régulation transcriptionnelle des gènes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II (Cycon et al., 2013). CIITA est le premier NLR à avoir été décrit en 1993 (Steimle et al., 1993).

La sous famille NLRB contient un domaine BIR (Baculovirus Inhibitor Repeat), chez l'homme, elle ne contient qu'un seul membre, NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein), quand 4 versions de NAIP sont retrouvées chez la souris (Kersse et al., 2011).

NAIP et NLRC4 peuvent s'associer et seront activés par la flagelline et par des composants bactériens du système de sécrétion de type III (SST3). La



reconnaissance des protéines SST3 dépend des séquences peptidiques présentes en C-terminal, qui sont similaires à certaines régions retrouvées sur la flagelline. Chez la souris, NAIP5 et NAIP6 détectent la flagelline tandis que NAIP2 détecte des protéines SST3. Chez l'homme, NAIP reconnaît plus efficacement les protéines SST3 que la flagelline. Une interaction directe entre la flagelline ou SST3 avec les NAIP n'a pas encore été prouvée mais des résultats provenant d'immunoprécipitation ont montré l'existence d'un complexe NAIP5/NLRC4/flagelline (Halff et al., 2012; Zhao et al., 2011), et d'un complexe NAIP2/NLRC4/ PrgJ, PrgJ étant une protéine SST3 (Kofoed and Vance, 2011) .

La sous-famille NLRC contient un domaine CARD qui sert au recrutement des caspases avec pour exception NLRC5.

NOD1 (NLRC1) et NOD2 (NLRC2) régulent la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) dans les cellules myéloïdes et les lymphocytes après activation par des fragments de peptidoglycanes présents chez les bactéries Gram négatif et chez quelques Gram positif. Le mécanisme par lequel NOD1 et NOD2 sont activés reste à déterminer. Des études par résonance plasmonique de surface de NOD2 ont montré une interaction directe de NOD2 avec l'un de ses ligands, MDP, lorsque le pH est situé entre 5 et 6.5 ce qui pourrait affecter le repliement de NOD2 (Grimes et al., 2012).

NLRC3, qui est exprimé dans les lymphocytes T et les NK (Natural Killer) (Conti et al., 2005), inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B par la voie des TLR en limitant l'ubiquitinylation de la protéine TRAF6 (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor).

Comme vu précédemment, NLRC4 a besoin des protéines NAIP2 ou NAIP5 et 6 pour former un inflammasome fonctionnel. Son activation par des composants bactériens mène à la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18.

NLRC5 est exprimé par les lymphocytes T et B, dans les cellules dendritiques et les macrophages. Il est responsable de la régulation du CMH de classe I et a été montré comme interagissant de façon directe avec le promoteur du gène (Kobayashi and van den Elsen, 2012). NLRC5 est induit par divers produits bactériens et viraux comme le poly(I :C) ou le CpG ainsi que par les interférons de type I et II.

NLRX1, qui est situé dans la mitochondrie, détecte l'ARN simple et double brin via son domaine LRR. Son activation provoque la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et peut réguler négativement les réponses inflammatoires antivirales via la voie MAVS(Mitochondrial Antiviral-Signaling protein)-RIG-1 (Xiao and Ting, 2012).

La sous-famille NLRP regroupe 14 membres qui sont caractérisés par la présence du domaine PYD (PYrin Domain) en N-terminal. NLRP1 possède en plus un domaine CARD en C-terminal alors que NLRP10 est dépourvu du domaine LRR.

Il est possible de séparer les NLRP en deux sous-catégories, l'une contenant les NLRP (NLRP4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13 et 14) qui ne forment pas d'inflammasome ou dont l'inflammasome n'a pas encore été observé et une autre qui rassemble les NLRP (NLRP1, 2, 3, 6, 12) formant un inflammasome fonctionnel composé du NLRP, de la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) et de la pro-caspase-1. Les NLRP7, 8, 11 et 13 sont absents chez la souris ce qui rend leur étude plus complexe.

Les NLRP ne formant pas d'inflammasome sont retrouvés dans les oocytes, les embryons ou les testicules où ils jouent un rôle essentiel sur la fertilité ou le développement de l'embryon (Ponsuksili et al., 2006; Tian, Pascal, and Monget, 2009; Westerveld et al., 2006) .

Certains NLRP ont également d'autres fonctions, comme NLRP4. NLRP4 est capable via son domaine NACHT de se lier à Beclin1, une molécule importante dans la régulation de l'autophagie. Cette interaction inhibe l'induction de l'autophagie par Beclin1 (Jounai et al., 2011). NLRP4 est également responsable de la régulation négative de la production d'interféron de type I grâce à son interaction avec l'ubiquitine ligase E3 DTX4 qui mène à la dégradation de TBK1, molécule essentielle dans la voie de production des interférons de type I (Cui et al., 2012). NLRP10 est particulièrement exprimé dans la peau et les testicules, son expression dans d'autres organes diffère selon les espèces. NLRP10 est capable d'inhiber la production d'IL-1 $\beta$  induite par ASC, ainsi que l'activation de NF- $\kappa$ B et l'apoptose. Cependant, NLRP10 contribue de façon positive aux réponses inflammatoires impliquant NOD-1, suggérant une collaboration entre ces deux protéines (Damm, Lautz, and Kufer, 2013).

Seuls cinq NLRP sont capables de former un inflammasome fonctionnel et si l'activation de ces différents inflammasomes mène toujours à la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18, les circonstances et les types cellulaires dans lesquels se passe cette activation diffèrent.

NLRP1 est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les types cellulaires (Kummer et al., 2007). Chez la souris, NLRP1 ne possède pas de domaine PYD en N-terminal, pourtant caractéristique de la famille NLRP. De ce fait, même s'ils sont tout deux activés par le muramyl dipeptide, les différences dans la composition de NLRP1 chez la souris et chez l'homme rendent les transpositions d'une espèce à l'autre difficiles (Faustin et al., 2007; Hsu et al., 2008). NLRP1 peut interagir avec la pro-caspase1 et la protéine adaptatrice ASC pour former un inflammasome. L'inflammasome NLRP1 a été décrit dans le système nerveux central où il a été observé dans les neurones après une lésion (Abulafia et al., 2009).

NLRP2 est exprimée dans de nombreux types cellulaires dont les tissus cérébraux. NLRP2 s'associe avec ASC et la caspase-1 et inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B. Si la question est longtemps restée ouverte quant à la fonctionnalité de l'inflammasome formé par NLRP2, il a récemment été prouvé que dans les astrocytes humains, l'inflammasome NLRP2 interagissait avec la pannexine 1 et le récepteur P2X7 et que l'ATP extracellulaire provoquait le clivage de la caspase-1 et la production d'IL-1 $\beta$  mature par cet inflammasome (Minkiewicz, de Rivero Vaccari, and Keane, 2013). NLRP2 joue également un rôle essentiel lors du développement embryonnaire de la souris puisque sa déplétion provoque l'arrêt du développement (Peng et al., 2012).

NLRP3 est le NLR le plus étudié. Son implication dans diverses maladies comme Alzheimer, l'athérosclérose, les allergies ou le cancer, a été prouvée de maintes fois. Il sera abordé plus en détail dans le chapitre qui lui est consacré.

NLRP6 est capable de former un inflammasome fonctionnel menant à la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. NLRP6 est fortement exprimée dans les tissus intestinaux où il protège l'organisme contre la colite inflammatoire et le cancer du colon (Normand et al., 2011), influence la composition de la flore bactérienne commensale et limite l'inflammation (Chen et al., 2011).

NLRP12 est exprimé dans les cellules dendritiques et les neutrophiles. Elle est liée à la dermatite atopique et aux fièvres héréditaires récurrentes chez l'homme.

NLRP12 est responsable de la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 après infection par certains pathogènes comme *Yersinia pestis* (Vladimer et al., 2012). En l'absence de NLRP12, les cellules dendritiques et les neutrophiles expriment CCR7 et CXCR4, mais sont incapables de répondre à leurs ligands, CCL19, CCL21 et CXCL12, ce qui modifie la migration de ces cellules dans les ganglions lymphatiques (Arthur et al., 2010).

#### b. L'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 est de loin le plus étudié. La première étude relatant la formation de l'inflammasome NLRP3 date de 2004 et a été effectuée par Agostini (Agostini et al., 2004). NLRP3 a été retrouvé dans les cellules myéloïdes, principalement les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (Guarda et al., 2011). Une expression modérée de NLRP3 a également été observée dans les lymphocytes T CD4 helper (Th) (Sutterwala et al., 2006). NLRP3 est impliqué dans la réponse à de nombreux pathogènes comme la listeria, les salmonelles ou encore le staphylocoque doré (Vladimer et al., 2013). Son implication dans de nombreuses maladies a d'ores et déjà été démontrée que ce soit le diabète, les allergies, les maladies inflammatoires chroniques, la goutte, l'athérosclérose, Alzheimer ou différents cancers. Dans de nombreux modèles, NLRP3 a un effet délétère et dans les expériences réalisées chez la souris, son inhibition augmente la survie globale (Masters, 2013). Cependant, l'équipe de Kanneganti a montré que NLRP3 pouvait avoir un effet protecteur dans le colon lors d'inflammation et lors de la tumorigenèse via sa production d'IL-18 par des cellules épithéliales intestinales ou des cellules immunitaires (Zaki et al., 2010a; Zaki et al., 2010b). L'IL-18 pourrait jouer son rôle en régulant la boucle IL-22/IL-22BP qui protège la muqueuse colique (Huber et al., 2012). A l'inverse, en effectuant une approche expérimentale similaire, une autre équipe a observé un effet délétère de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Bauer et al., 2010). Le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la colite inflammatoire et la cancérogenèse colique reste donc controversé.

### i. L'activation de l'inflammasome NLRP3

La formation de l'inflammasome NLRP3 a lieu après qu'un stimulus ait été détecté par la protéine NLRP3. Une fois activé, NLRP3 change de conformation et se lie à la protéine adaptatrice ASC via une interaction de leur domaine PYD respectif. La pro-caspase-1 est également recrutée grâce à une interaction de son domaine CARD avec le domaine CARD présent sur ASC et va s'autoactiver (Figure 4). La caspase-1 active va alors cliver la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 en IL-1 $\beta$  et IL-18 matures (Shaw, McDermott, and Kanneganti, 2011).

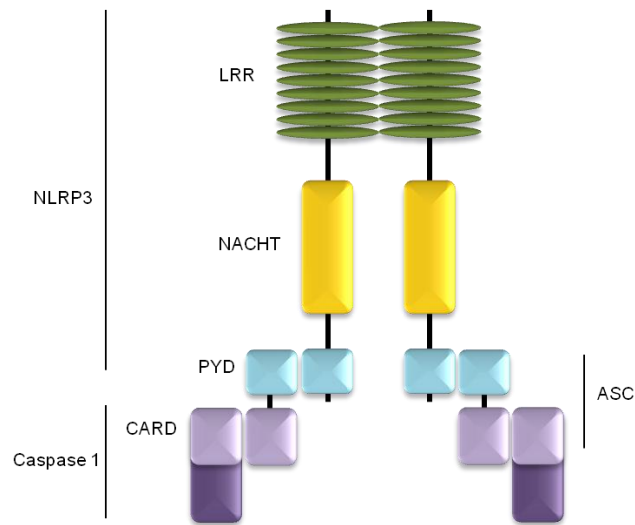


Figure 4: Composition de l'inflammasome NLRP3.

L'inflammasome NLRP3 est un complexe tri-protéique constitué de la protéine NLRP3, de la protéine adaptatrice ASC, qui permet via son domaine CARD, l'interaction avec la Caspase-1. Cette interaction active la caspase-1 qui peut alors cliver la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 en cytokines matures.

### ii. Les voies d'activations de l'inflammasome

Afin d'arriver à la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 matures par l'inflammasome NLRP3, les cellules ont besoin de recevoir deux signaux. Le premier signal sert à l'augmentation de la production des protéines NLRP3 et pro-IL-1 $\beta$ . Ce premier signal a lieu via l'activation de TLR par une multitude de ligands microbiens ou via l'activation du récepteur au TNF- $\alpha$  qui vont déclencher la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau. NF- $\kappa$ B va alors augmenter la transcription de NLRP3 et de la pro-IL-1 $\beta$ . Le second signal sert à activer NLRP3. Il existe plusieurs voies hypothétiques dont trois majoritaires (Figure 5) :

- les efflux de potassium, provoqués par l'ATP extracellulaire, ou par des toxines formant des pores dans la membrane plasmique (Petrilli et al., 2007).

- Les espèces réactives de l'oxygène, qui sont produites par les mitochondries et qui interagiraient de façon directe ou indirecte avec NLRP3 (Dostert et al., 2008).

- La cathepsine B, protéine lysosomale, activerait NLRP3 soit en le clivant en une forme active soit en interagissant avec lui. L'entrée de la cathepsine B dans le cytoplasme a lieu après la perméabilisation du lysosome par les cristaux d'acide urique ou de cholestérol ou par des protéines comme Bax (Bcl2 Associated X protein) (Boya and Kroemer, 2008).

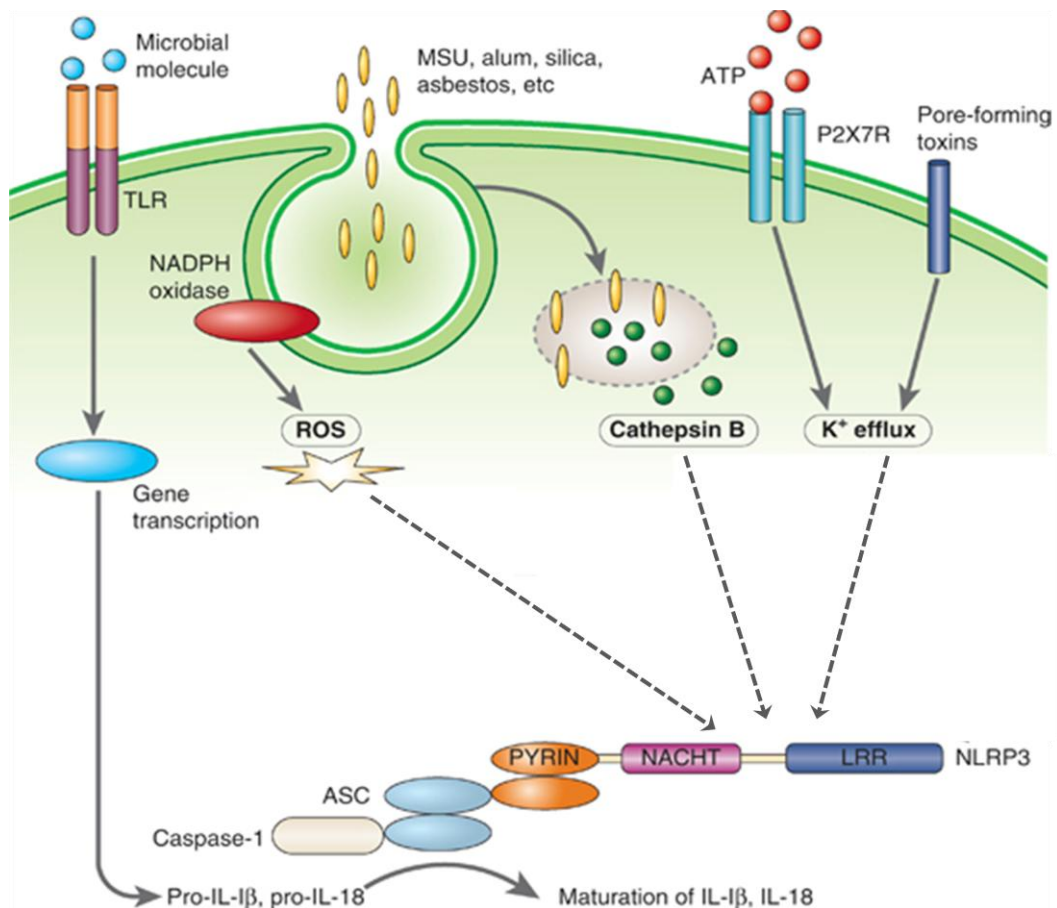


Figure 5 : Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3.

Trois voies principales concernant l'activation de l'inflammasome NLRP3 ont été décrites. La première implique les espèces réactives de l'oxygène, la seconde, une protéine lysosomale nommée cathepsine B et la dernière concerne les efflux de potassium et de façon plus large les mouvements ioniques. Adapté de (Jin and Flavell, 2010)

Deux protéines, GBP5 (Guanylate-Binding Protein 5) et PKR (double-stranded RNA-dependent Protein Kinase) ont récemment été identifiées comme exerçant des rôles dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. GBP5 interagit avec le domaine pyrine de NLRP3 et aide à l'oligomérisation de l'inflammasome. Son action se limite cependant à la formation de l'inflammasome par des bactéries et non lors d'une inflammation stérile (Shenoy et al., 2012). PKR s'autophosphoryle dans les macrophages après une stimulation par des ligands de NLRP3. Une fois activé, PKR se lie à NLRP3 (ainsi qu'à NLRP1, NLRC4 et AIM2) et l'activerait (Lu et al., 2012a).

### iii. Les cytokines pro-inflammatoires

L'IL-1 a été découverte dans les années 1940 comme facteur soluble libéré par les granulocytes. Il existe trois membres dans la famille de l'IL-1, deux agonistes, l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  et un antagoniste, l'IL-1Ra. Ces molécules ont une structure quaternaire très proche, ce qui leur permet de se lier aux mêmes récepteurs (O'Neill and Greene, 1998). De façon plus large, il existe 11 membres dans la famille de l'IL-1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-18, IL-33, IL-37, IL-38 et l'IL-36 qui existe en quatre isoformes), à part l'IL-37, qui est anti-inflammatoire et l'IL-1Ra, toutes ces cytokines ont des effets pro-inflammatoires.

La pro-IL-1 $\beta$  est une molécule de 31kDa qui est clivée par la caspase-1 en IL-1 $\beta$  mature et active de 17,5kDa. La liaison de l'IL-1 $\beta$  au récepteur IL-1R1 déclenche la transduction d'un signal intracellulaire grâce au domaine TIR. La liaison de l'IL-1 $\beta$  avec le récepteur IL-1R2 ne déclenche aucun signal du à l'absence du domaine TIR sur ce récepteur. La fixation de l'IL-1 $\beta$  sur le récepteur IL-1R1 active les voies de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et NF- $\kappa$ B via MyD88 (Figure 6). L'activation de ces voies conduit à la production de molécules inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE2, TNF- $\alpha$ ...), de chimiokines (CXCL8) et augmente l'expression d'iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase).

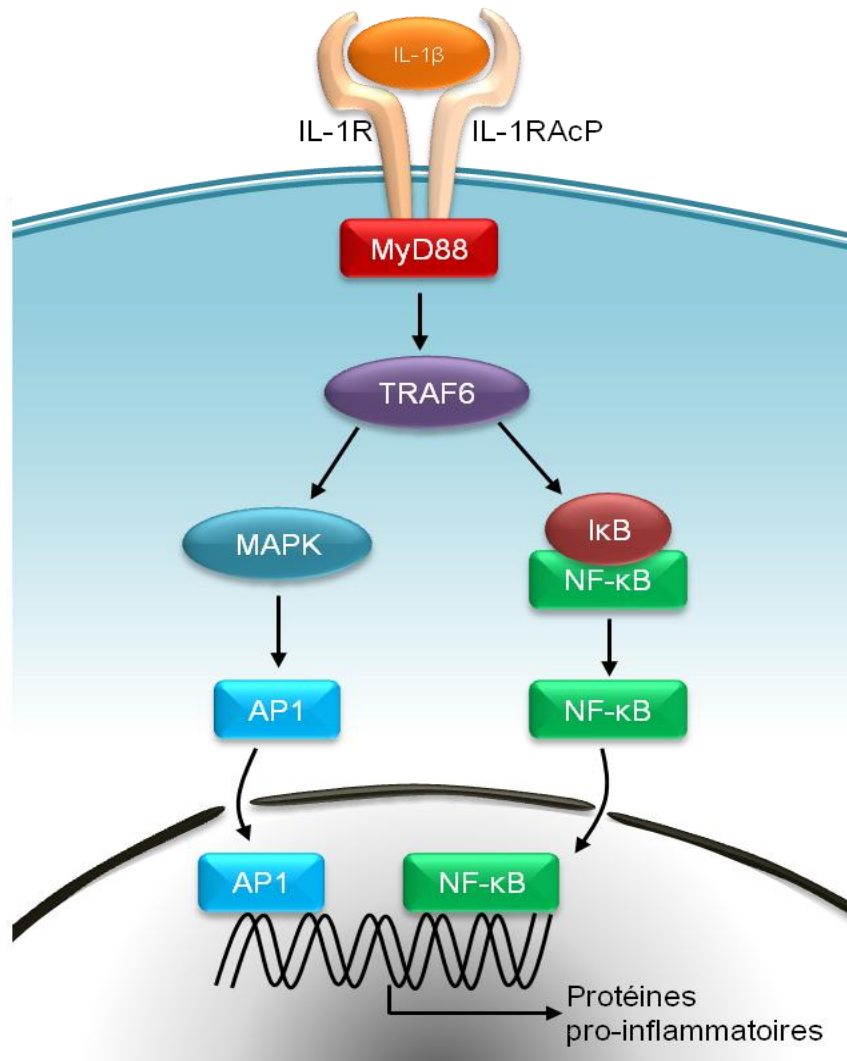


Figure 6 : Voies de signalisation de l'IL-1 $\beta$ .

Lorsque l'IL-1 $\beta$  se lie à son récepteur, elle active la voie NF- $\kappa$ B et la voie des MAP Kinases et mène à la production de protéines pro-inflammatoires.

Le TNF- $\alpha$  a été isolé en 1975 et décrit comme un facteur soluble libéré par des cellules de l'hôte ayant provoqué la nécrose d'une tumeur transplantée (Carswell et al., 1975). Le nom de facteur de nécrose tumorale est abusif car le TNF- $\alpha$  ne provoque pas la nécrose de toutes les tumeurs, il peut même stimuler la croissance de certaines. Le TNF- $\alpha$  est synthétisé sous la forme d'un précurseur transmembranaire de 26kDa qui est clivé par une métalloprotéase en une protéine active de 17kDa. Le TNF- $\alpha$  est reconnu par deux récepteurs, les TNFR1 et 2. Le domaine de mort cytoplasmique de TNFR1 interagit avec celui de l'adaptateur TRADD (Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein), permettant l'association de RIP1 (Receptor-Interacting serine/threonine-Protein) au complexe. TRAF2 est alors recruté et servira d'adaptateur pour les ubiquitines ligases cIAP1 (Inhibitor of Apoptosis) et cIAP2.



Ces protéines forment le complexe I, qui mène à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK tout comme l'IL-1 $\beta$  (Dickens et al., 2012) (Figure 7).

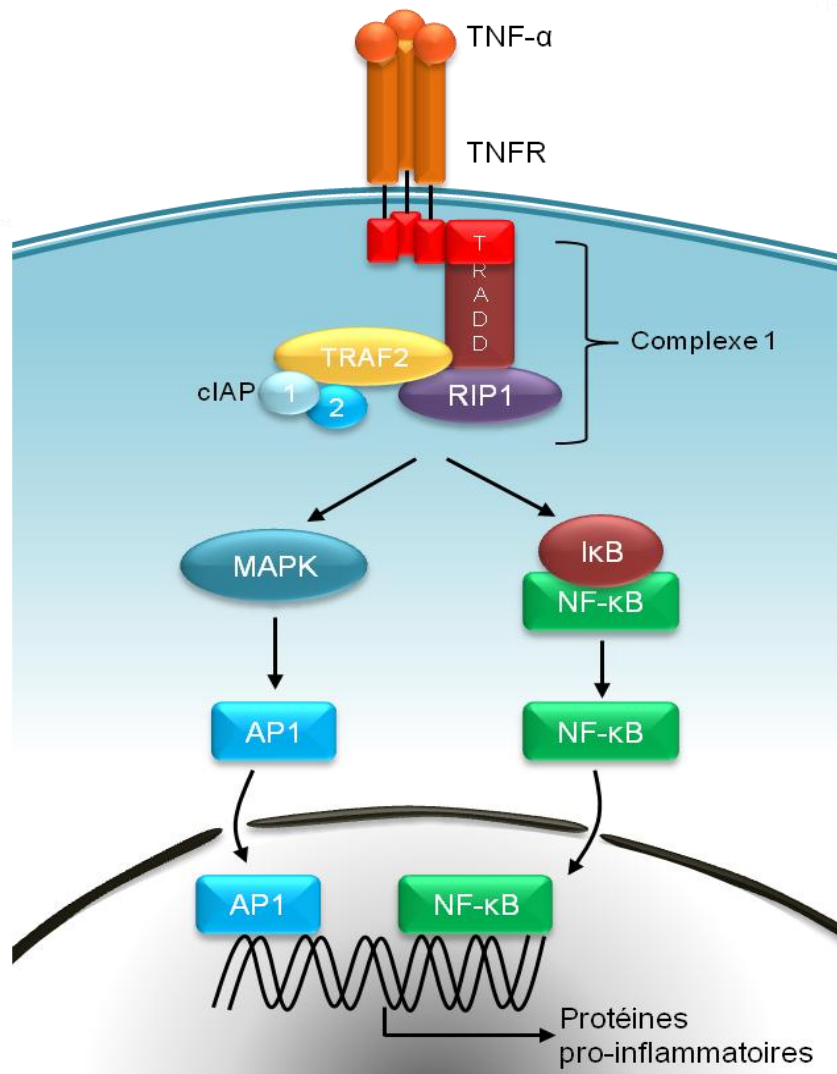


Figure 7: Voies de signalisation du TNF- $\alpha$ .

En se liant à son récepteur, le TNF- $\alpha$  provoque l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAP kinase via le complexe 1, formé de TRADD, RIP1, TRAF2 et des cIAP1 et 2.

L'IL-6 a été découverte dans les années 1980 comme facteur de différenciation des lymphocytes B. Elle fait entre 22 et 26kDa suivant son niveau de glycosylation. Son expression est induite de façon transitoire dans les lymphocytes T et B et les cellules myéloïdes après stimulation mais aussi par des cellules non-immunitaires (astrocytes, cellules épithéliales, fibroblastes...). L'IL-6 est importante pour la survie et la différenciation de certains lymphocytes T CD4 et de façon indirecte, via l'IL-21, pour la différenciation des lymphocytes

B. La liaison de l'IL-6 avec son récepteur, l'IL-6R, active via GP130 la voie JAK (JAnus Kinase)-STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) qui régule la transcription de gènes anti-apoptotiques, de cytokines et de récepteurs de cytokines (Rincon and Irvin, 2012)(Figure 8).

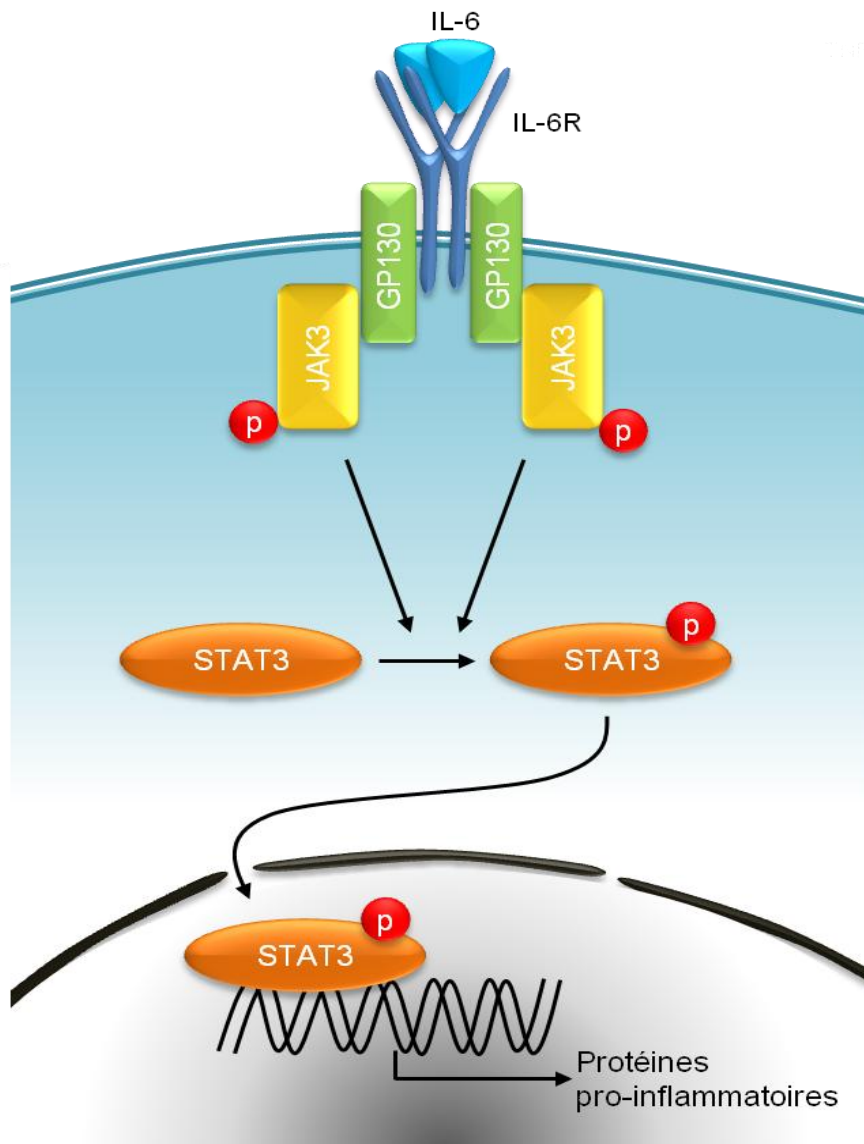


Figure 8 : Voie de signalisation de l'IL-6.

Après liaison avec son récepteur, l'IL-6 active la phosphorylation de JAK3 via GP130. JAK3 induit ensuite la phosphorylation de STAT3, qui provoque alors la transcription de protéines pro-inflammatoires.

## B. Cancer et immunosuppression

### 1. Généralité

Avec 365 500 nouveaux cas diagnostiqués en France en 2011, le cancer reste un problème de santé publique majeur. Chez l'homme, les cancers les plus courants sont ceux de la prostate, du poumon et le cancer colorectal alors que chez la femme, le cancer du sein est le plus commun suivi du cancer colorectal et du cancer du poumon (Figure 9). En France, le cancer représente la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes. Si le traitement du cancer a été marqué par de nombreux progrès effectués ces trente dernières années, une compréhension plus approfondie de la biologie du cancer est nécessaire pour améliorer encore leur efficacité.

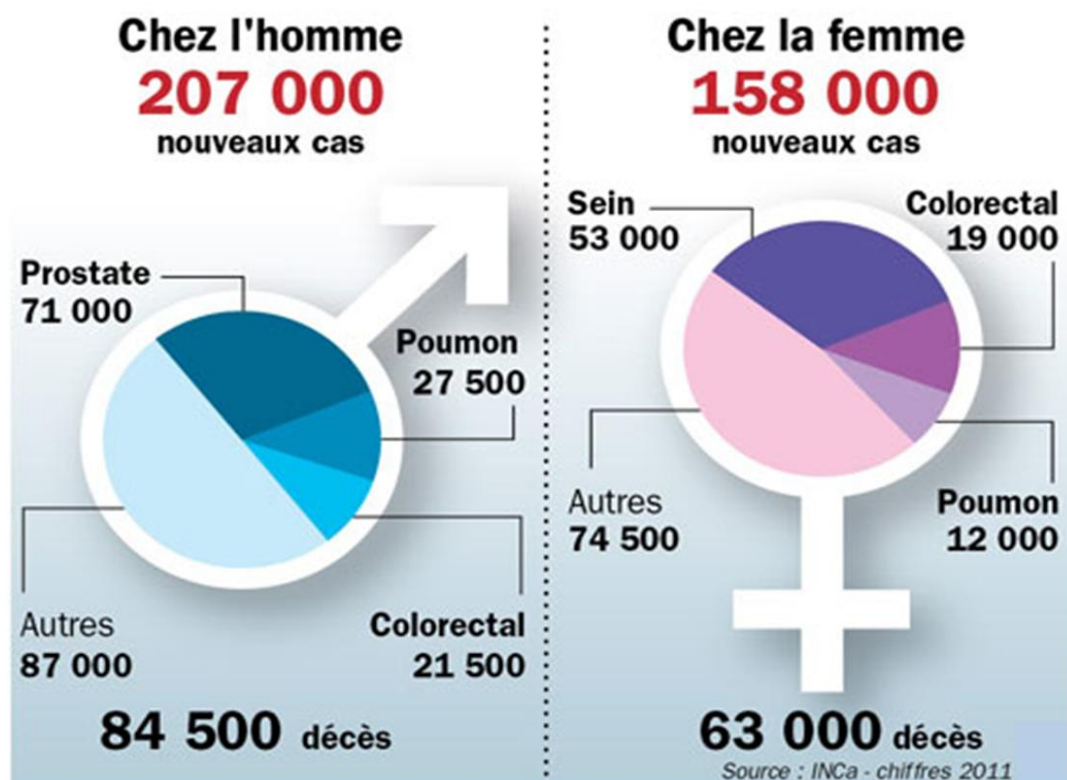


Figure 9 : Impact du cancer sur la population française.

Répartition des cancers les plus communs chez l'Homme et chez la Femme en 2011. INCa, 2011

## 2. Les traitements

### a. La chirurgie

La résection de la tumeur est un acte opératoire qui a pour but de retirer manuellement la tumeur solide. Dans la majorité des cas, il s'agit du premier traitement effectué après le diagnostic de la tumeur. La chirurgie est souvent couplée avec la chimiothérapie ou la radiothérapie pour augmenter les chances d'élimination totale des cellules tumorales.

### b. La radiothérapie

La radiothérapie a été développée au début du XX<sup>ème</sup> siècle grâce au travail de Marie Curie. L'invention de la tomodynamométrie en 1971 a permis d'améliorer grandement la précision des traitements par radiothérapie, principalement en termes de dose. La radiothérapie est un traitement loco-régional qui consiste en l'utilisation de rayonnements ionisants qui atteignent les tissus profonds après avoir traversé la peau et les tissus superficiels.

Il y a deux types de rayonnements utilisés : les rayonnements électromagnétiques (rayons X, rayons gamma) et les rayonnements constitués de particules élémentaires (électrons, protons, neutrons). Les rayonnements vont détruire les cellules cancéreuses en induisant des altérations de l'ADN (cassures simple et double brins et modifications de bases). Si les altérations ne sont pas suffisamment importantes, elles mèneront à un changement fonctionnel ou structurel des cellules ionisées. Le principal défaut de la radiothérapie concerne sa capacité à toucher aussi bien les cellules cancéreuses que les cellules saines d'où l'importance de maîtriser précisément la quantité de rayons utilisée.

### c. La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'utilisation de molécules chimiques cytotoxiques qui peuvent agir à différents niveaux du cycle cellulaire pour stopper ou détruire les cellules cancéreuses.

Il existe différentes classes de molécules, la première comprend les inhibiteurs de la synthèse d'ADN dont les anti-métabolites, qui exercent un blocage au niveau des composants ou de la synthèse d'ADN, avec le 5-fluorouracile et la gemcitabine (analogues des bases pyrimidiques) (Figures 10 et 11) et le méthotrexate (antifolate) mais aussi les inhibiteurs d'enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN comme l'irinotécan et le topotécan (inhibiteurs des topoisomérases) (Ueno, Kiyosawa, and Kaniwa, 2007).

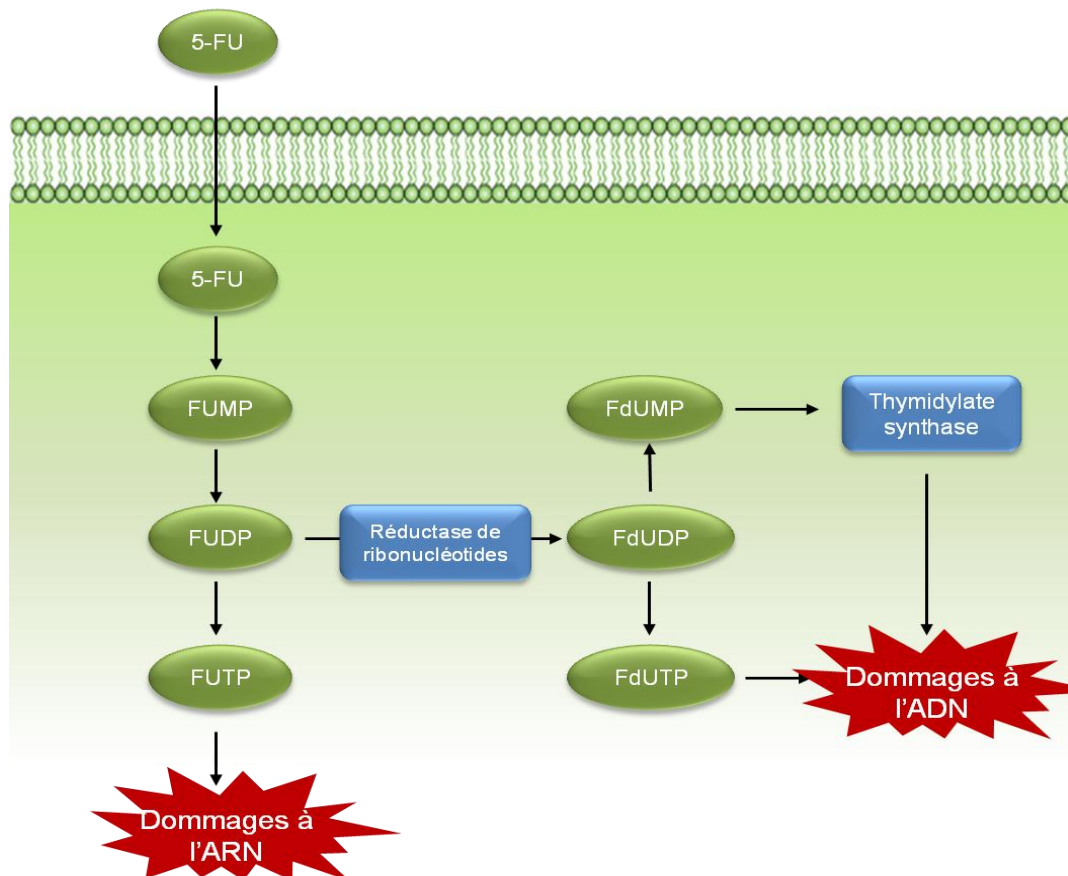


Figure 10 : Mode d'action du 5-FU.

Après avoir pénétré dans la cellule, le 5-FU subit une série de modifications lui permettant d'endommager la cellule de trois façons différentes. Il peut se modifier en fluoro-UTP pouvant s'intégrer dans l'ARN et bloquer sa synthèse, ou en fluoro-désoxyUTP qui s'intègre et bloque la synthèse d'ADN ou encore en fluoro-désoxyUMP qui inhibe la thymidylate synthase, enzyme responsable de la fabrication de dTMP, nécessaire à la synthèse d'ADN. D'après (Longley, Harkin, and Johnston, 2003)

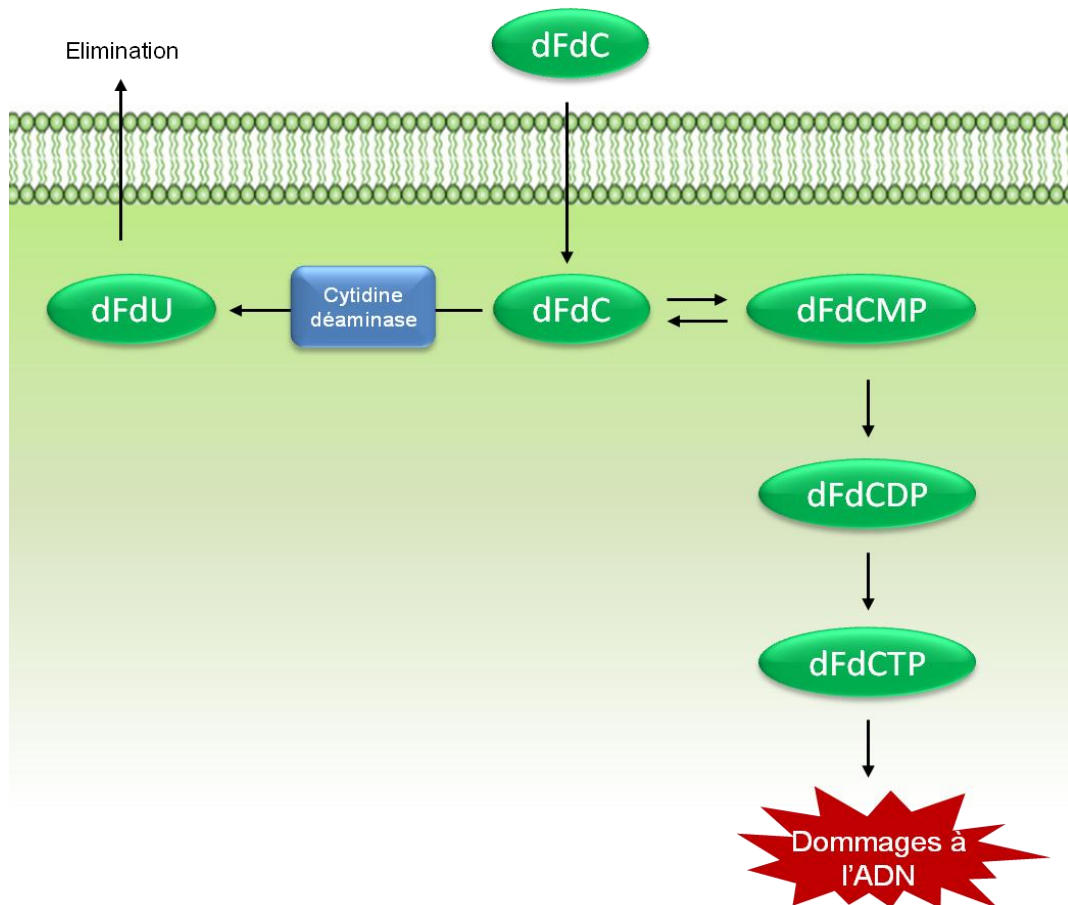


Figure 11 : Mode d'action de la Gemcitabine.

Dans la cellule, la Gemcitabine, ou dFdC, se modifie en desoxy-fluoro-desoxyCTP qui est intégré à la place du CTP dans l'ADN et bloque ainsi sa synthèse. La Gemcitabine peut cependant être éliminée de la cellule après une modification par la cytidine déaminase, permettant la survie de la cellule. D'après (Ueno, Kiyosawa, and Kaniwa, 2007)

Le 5-Fluorouracile et la gemcitabine sont les deux chimiothérapies étudiées dans la première étude menée lors de cette thèse. Ces deux molécules sont très couramment utilisées dans le traitement de différents cancers.

Le 5-Fluorouracile est une chimiothérapie principalement utilisée dans le traitement des adénocarcinomes digestifs et mammaires. Dans le traitement des cancers digestifs, il est associé à l'acide folinique (protocole FUFOL), qui renforce la sensibilité de la thymidylate synthase. Il peut également être associé à l'irinotécan (protocole FolFiri) qui est un inhibiteur de la topo-isomérase, ou avec de l'oxaliplatine (protocole FolFox), le protocole FolFirinox prévoit l'inoculation de toutes ces molécules à la fois (irinotécan, oxaliplatine, acide folinique et 5-FU). Dans le traitement des adénocarcinomes mammaires, le 5-FU est utilisé après un traitement locorégional ou lors des rechutes. Il est alors utilisé en association

avec l'adriamycine et le cyclophosphamide (protocole FAC) ou avec de l'épirubicine et du cyclophosphamide (protocole FEC).

La gemcitabine est utilisée dans le traitement du cancer du sein métastatique en association avec le paclitaxel. Seule, la gemcitabine est utilisée dans le traitement du cancer du pancréas et en association avec le carboplatine dans le cancer de l'ovaire. Cette chimiothérapie est également utilisée dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules et de la vessie en combinaison avec le cisplatine.

La seconde classe de molécules regroupe celles qui interagissent avec l'ADN comme les agents alkylants (cyclophosphamide, cisplatine, oxaliplatine, mitomycine-C), les agents intercalants (anthracyclines) ou les agents scindants (bléomycine). Dans la troisième classe se retrouvent les molécules qui interagissent avec des enzymes ou des protéines tels que les antimétabolites qui empêchent la division cellulaire en bloquant la mitose (taxanes). Enfin, il existe des molécules qui vont agir sur l'ARN messager ou l'ARN de transfert comme l'actinomycine D.

Les chimiothérapies peuvent être utilisées seules ou en association avec de la radiothérapie ou des thérapies ciblées.

#### d. L'immunothérapie

Les tumeurs, étant des cellules du soi, sont par nature assez peu immunogènes, ce qui signifie qu'elles ne vont pas être reconnues comme étrangères par le système immunitaire qui va les tolérer et les laisser proliférer. L'immunothérapie stimule les défenses immunitaires de l'organisme afin qu'il agisse contre les cellules cancéreuses.

L'immunothérapie non spécifique stimule globalement le système immunitaire, elle consiste en l'injection de cytokines stimulatrices (IL-2, IFN- $\gamma$ ) ou en l'inhibition de cytokines inhibitrices pour le système immunitaire (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6...).

L'immunothérapie passive représente une partie importante des thérapies ciblées. Elle consiste à administrer au malade des anticorps monoclonaux qui sont séparables en deux catégories, les premiers sont dirigés contre des protéines présentes à la surface des cellules cancéreuses ou contre des

facteurs nécessaires à leur prolifération. Dans la seconde catégorie se trouvent les anticorps qui vont activer le système immunitaire. L'immunothérapie active a pour but d'initier une réponse immunitaire adaptative spécifique de la tumeur.

La première catégorie contient les anticorps dirigés contre une protéine présente à la surface des cellules cancéreuses et qui vont activer l'ADCC (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity). Ces anticorps ciblent la protéine à la surface de la cellule cancéreuse et leur partie Fc est reconnue par les monocytes, les macrophages ou les NK qui vont ensuite lyser la cellule cancéreuse. Cette catégorie contient les anti-Her2/neu pour le cancer du sein et les anti-CD20, anti-CD3, anti-CD30 et anti-CD33 pour les différents types de lymphomes.

Dans la seconde catégorie se trouvent les anti-PD-L1 (Programmed cell Death 1 Ligand 1), les anti-PD-1 (Programmed cell Death) et les anti-CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen) qui activent le système immunitaire en empêchant la mort des lymphocytes T.

L'injection du bacille de Calmette-Guérin (BCG) est utilisée dans le traitement du cancer de la vessie où il a prouvé son efficacité après chirurgie depuis plus de 35 ans. L'injection dans la vessie du BCG permet l'activation de lymphocytes T et la production de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2, entre autre. Dans plus de 50% des cas, la tumeur ne repart pas, ce qui fait de cette immunothérapie l'un des traitements anticancéreux existants les plus efficaces.

#### e. L'hormonothérapie

Certaines tumeurs sont connues pour être hormonales-dépendantes (cancer du sein, de l'utérus ou de la prostate). Dans ces cas précis, l'hormonothérapie est une stratégie envisageable. Elle consiste à bloquer la production d'hormones des ovaires ou des testicules. Si la tumeur ne présente pas à sa surface les récepteurs hormonaux, cette thérapie n'aura aucune efficacité d'où l'importance de faire une biopsie en amont du traitement.

#### f. La vaccination

Un vaccin peut traiter un cancer déjà établi ou empêcher l'apparition de cancers quand ils sont causés par des virus (hépatites, HPV) comme c'est le cas pour le cancer des cervicales, de l'utérus ou certains cancers du foie. Les vaccins



préventifs entraînent le système immunitaire à se défendre contre ces virus, les empêchant d'infecter l'organisme et donc de causer le développement d'un cancer.

Les vaccins utilisés en cas de cancer établi ont pour but de déclencher une réaction immunitaire contre une protéine présente sur la cellule tumorale afin que le système immunitaire attaque ces cellules. Des vaccins sont en cours de développement pour les cancers du sein, du poumon, du colon, du rein, de la prostate et les mélanomes principalement. Certains vaccins ont permis une augmentation de la survie dans des essais cliniques de phase III (Provenge contre le cancer de la prostate, BiovaxID contre le lymphome folliculaire entre autre). De par l'instabilité génétique des cellules cancéreuses, il est très compliqué d'établir un vaccin provoquant une réponse immunitaire dirigée contre une protéine présente sur toutes les cellules cancéreuses de plusieurs patients.

### 3. Les 10 caractéristiques des cellules cancéreuses

La biologie du cancer a connu de grands changements mais reste cependant un sujet de recherches actives. Weinberg a présenté un modèle identifiant 10 grandes caractéristiques des cellules cancéreuses permettant notamment d'expliquer les processus biologiques de la maladie cancéreuse et ainsi souligne qu'un cancer se caractérise par des anomalies de la cellule tumorale mais aussi du stroma (Hanahan and Weinberg, 2011)(Figure 12).

Les mutations et l'instabilité du génome sont à l'origine des cellules cancéreuses. Ces changements du génome sont liés à une accumulation successive de mutations qui permettent à la cellule cancéreuse d'acquérir les nouvelles fonctions nécessaires à sa transformation. Ainsi, l'une des caractéristiques primordiales des cellules cancéreuses concerne leur capacité à proliférer grâce à leur production autocrine de signaux de croissance. Deux caractéristiques complémentaires renforcent la capacité à proliférer des cellules cancéreuses : elles échappent à la régulation négative de la prolifération dépendante des gènes suppresseurs de tumeur et développent un potentiel de réplication illimité grâce à l'expression de la télomérase (Blasco, 2005), une enzyme qui protège les extrémités des chromosomes, évitant l'entrée des

cellules cancéreuses en sénescence. Les cellules cancéreuses ont également un métabolisme du glucose modifié dans lequel la glycolyse est la voie métabolique prédominante, que la cellule soit en aérobie ou en anaérobie. Ce changement peut sembler étrange sachant que la glycolyse libère environ 18 fois moins d'ATP que la voie mitochondriale. Cependant, celle-ci produit une variété plus importante d'intermédiaires glycolytiques rentrant dans diverses voies de biosynthèse, dont celles des acides aminés ou encore des nucléosides, augmentant ainsi la production de ces voies de biosynthèse permettant une prolifération cellulaire active (Warburg, 1956). De plus, les cellules cancéreuses peuvent, en effectuant une « transition épithélio-mésenchymateuse » de façon transitoire ou stable, acquérir la capacité à envahir les tissus et à former des métastases dans des organes différents de celui de la tumeur primaire (Klymkowsky and Savagner, 2009).

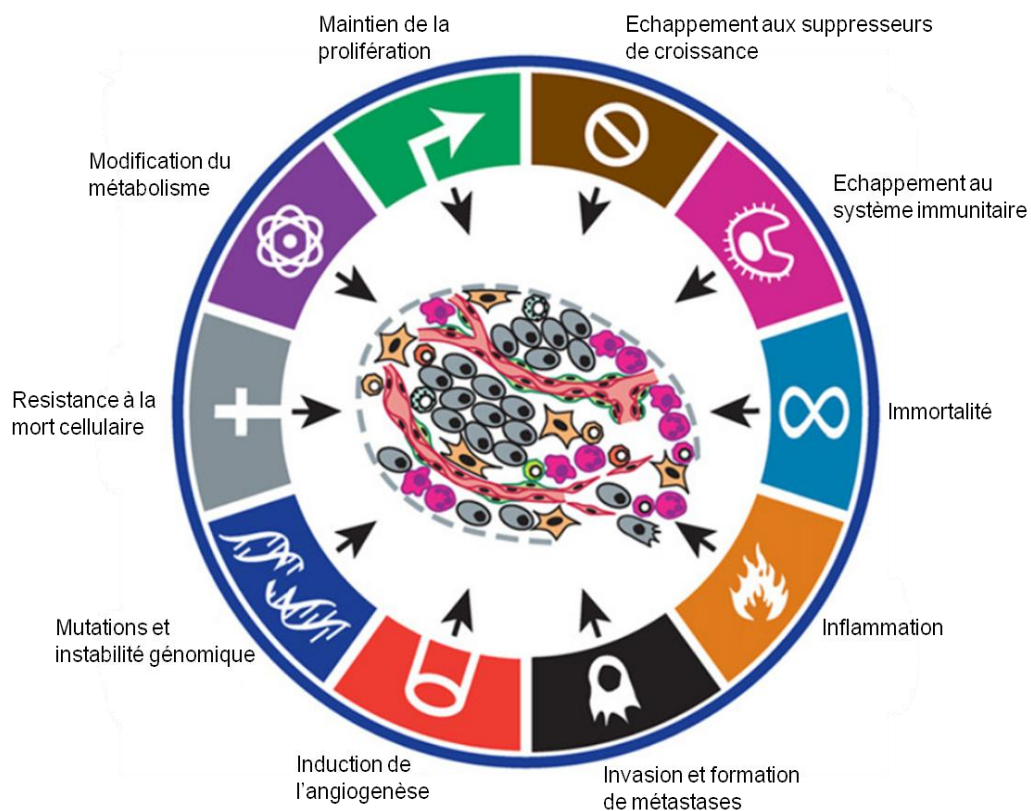


Figure 12 : Les dix caractéristiques des cellules cancéreuses.

Ce schéma représente les dix caractéristiques qui permettent aux cellules cancéreuses de survivre, de proliférer et d'envahir l'organisme. D'après (Hanahan and Weinberg, 2011).

En association avec ces caractéristiques de la cellule tumorale, des modifications du stroma sont indispensables à la biologie de la tumeur. Ainsi, la

tumeur étant une masse de cellules nouvellement formée, elle a besoin de mettre en place un réseau de vaisseaux sanguins afin de pouvoir procéder aux échanges de métabolites. Une angiogenèse active est une des caractéristiques retrouvée dans de nombreuses tumeurs solides et est nécessaire à leur développement (Hanahan and Folkman, 1996). Cette angiogenèse est activée grâce à la production de cytokines inflammatoires au sein de la tumeur par des cellules immunosuppressives et tumorales (Ferrara, 2010).

Les cellules tumorales étant caractérisées par des taux de mutations élevés, ces mutations peuvent être détectées par le système immunitaire qui joue alors un rôle dans le contrôle du développement tumoral. A l'inverse, une réponse immunitaire prolongée responsable d'inflammation chronique permet la progression tumorale, la dissémination de métastases et augmente l'instabilité génétique de la tumeur ainsi que l'immunosuppression locale. Ainsi la réponse immunitaire antitumorale reste un événement majeur dans l'initiation, le développement et le contrôle de la progression tumorale (Grivennikov, Greten, and Karin, 2010).

#### 4. La théorie de l'immunosurveillance des tumeurs

Au XX<sup>ème</sup> siècle, Paul Ehrlich fut le premier à énoncer la théorie de l'immunosurveillance des tumeurs. La théorie de l'immunosurveillance propose que le système immunitaire est capable de reconnaître et d'éliminer les cellules cancéreuses dès leur création. Cependant, les tumeurs peuvent dans certains cas progresser et échapper, au moins en partie, à sa surveillance. Les tumeurs sont capables de mettre en place divers mécanismes leurs permettant d'échapper au système immunitaire. La diminution du complexe majeur d'histocompatibilité I (CMHI) (Garcia-Lora, Algarra, and Garrido, 2003) à la surface des cellules cancéreuses ainsi que la mise en place de cellules immunosuppressives et la sécrétion de certaines cytokines par les cellules cancéreuses sont parmi les principaux moyens mis en place par la tumeur pour échapper au système immunitaire (Figure 13).

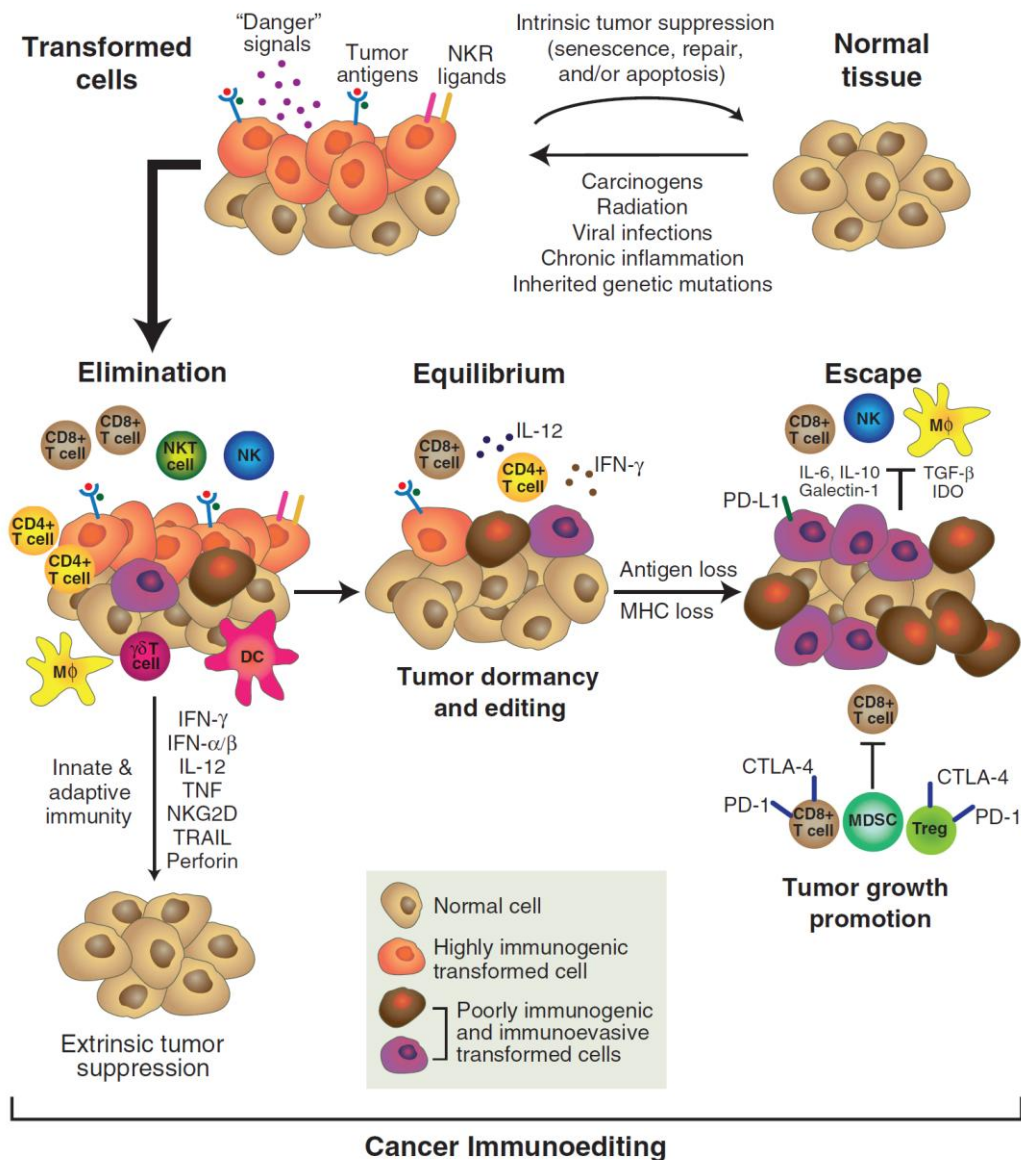


Figure 13 : Mécanismes de l'immunosurveillance

Il se compose de trois phases successives: l'élimination, l'équilibre, et l'échappement. Dans la phase d'élimination, l'immunité innée et adaptative travaillent ensemble pour détruire les tumeurs en développement. Si la réponse est efficace, le cancer est éliminé. Si, ce n'est pas le cas, les cellules tumorales entrent dans la phase d'équilibre qui implique uniquement des effecteurs de l'immunité adaptative. Lors de cette phase, l'immunogénicité des tumeurs est modifiée. Des variants de cellules tumorales peuvent émerger pour ne plus être reconnus par l'immunité adaptative, elles deviennent alors insensibles à la réponse immunitaire effectrice, et/ou elles induisent un état immunosuppresseur dans le microenvironnement de la tumeur. Ces cellules tumorales entrent dans la phase d'échappement, durant laquelle leur croissance n'est plus contenue par le système immunitaire. C'est à ce stade que la maladie devient détectable. D'après (Schreiber, Old, and Smyth, 2011)

## 5. L'inflammation dans le cancer

Des données cliniques et expérimentales ont montré que l'inflammation et plus particulièrement l'inflammation chronique, affecte les différentes phases de la carcinogénèse. L'inflammation favorise les mutations génétiques et épigénétiques qui mènent à la transformation de la cellule et à l'initiation du cancer. Les dégâts tissulaires, leur réparation et le taux de prolifération plus élevé retrouvés dans un tissu inflammé augmentent la probabilité de mutation et de translocation chromosomale durant la mitose. L'inflammation permet également la mise en place d'un microenvironnement favorable au développement de la tumeur et des métastases et aide à établir des mécanismes immunosuppresseurs qui limitent la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et les colites ulcéraives) sont par exemple des facteurs de risque majeur pour les cancers colorectaux.

### a. Les proto-oncogènes

44

---

RAS est un proto-oncogène muté dans environ 25% des cancers. Une mutation de RAS induit une réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire, la croissance de la tumeur et la néo-angiogenèse. L'activation de RAS active la voie ERK-MAP-kinase. ERK phosphoryle et active alors des facteurs de transcription qui mène à l'expression d'IL-1, IL-6, IL-11 et IL-8 (CXCL8). Ces protéines jouent des rôles importants dans les fonctions oncogéniques de RAS. En effet, l'IL-6 et l'IL-11 induisent la phosphorylation de STAT3 dans les cellules tumorales et les cellules stromales. Phospho STAT3 active miR-21 et miR-181b-1 qui inhibent PTEN et CYLD, qui sont des suppresseurs de tumeurs. La neutralisation de l'IL-6 retarde l'oncogénèse médiée par RAS (Ancrile, Lim, and Counter, 2007). Chez l'Homme, l'expression de CXCL8 à la surface des cellules tumorales attire les cellules inflammatoires (macrophages et neutrophiles) et induit l'angiogenèse (Sparmann and Bar-Sagi, 2004). Une fois activé, RAS interagit avec la PI3K (phosphoinositol 3-kinase). Cette interaction active la voie Akt/PKB qui augmente la survie des cellules tumorales en supprimant les fonctions pro-apoptotiques et en augmentant les fonctions anti-apoptotiques de la cellule tumorale.

D'autres oncogènes tels que RET, BRAF et MYC induisent également de l'inflammation et favorisent le recrutement de mastocytes et de macrophages au site de la tumeur. La mise en place d'une réponse inflammatoire a pour conséquence une augmentation de l'angiogenèse et de la résistance à l'apoptose, essentielles au développement de la tumeur (Trinchieri, 2012).

#### b. STAT3

L'IL-6, l'IL-10, l'IL-11, l'IL-21 et l'IL-23 sont les principales cytokines connues pour activer la phosphorylation de STAT3 dans les tumeurs et les cellules stromales. STAT3 permet en partie de faire le lien entre inflammation et cancer. Cette protéine est exprimée de façon précoce dans la carcinogénèse et augmente la survie des cellules tumorales, leur prolifération et leur dissémination grâce à son contrôle de l'expression de plusieurs gènes du cycle cellulaire et du proto-oncogène c-Myc. STAT3 a un effet anti-apoptotique via sa régulation négative de la transcription de p53, mais aussi via son activation de miR-21 et miR-181b-1 qui inhibent PTEN et CYLD, des suppresseurs de tumeurs (Trinchieri, 2012).

45

---

Les macrophages et les cellules dendritiques exprimant STAT3 produisent moins d'IL-12, qui est nécessaire à la différenciation des lymphocytes Th1 anti-tumoraux, mais produisent plus d'IL-23, cytokine induisant les lymphocytes Th17, dont le rôle dans les tumeurs est encore controversé. Dans les MDSC, la phosphorylation de STAT3 provoque une diminution de l'arginine et de la cystéine disponibles dans le milieu et qui sont indispensables au fonctionnement des lymphocytes T, ainsi qu'une augmentation de la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), d'IL-6, d'IL-10, des ROS et d'iNOS. L'IL-6 et l'IL-10 pouvant phosphoryler STAT3, une boucle de rétro-contrôle positif est alors créée (Chalmin et al., 2010).

#### c. Les espèces oxygénées

Dans une tumeur, les lésions qui font suite à l'hypoxie et au stress du au manque de nutriments induisent une augmentation de la production de ROS.

Ces ROS activent certains inflammasomes, qui produisent alors des cytokines inflammatoires et la mise en place d'une inflammation provoque des dommages à l'ADN. Ces dommages à l'ADN, cassures et mutations ponctuelles, modifient les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs ou les gènes contrôlant le cycle cellulaire et l'apoptose. Ces mutations participent à la mise en place de la carcinogénèse. Cependant, une équipe américaine a montré que les ROS provenant de la mitochondrie étaient également capables d'induire la production d'IL-6, de TNF et de CXCL8 indépendamment de l'inflammasome (Bulua et al., 2011).

Les RNS (Reactive Nitrogen Species) catalysent la production de monoxyde d'azote (NO). Les RNS sont principalement exprimées par les cellules inflammatoires et sont induites par l'IFN- $\gamma$  et le TNF. Les effets pro-tumoraux du NO concernent sa capacité à induire des dommages à l'ADN, à augmenter l'angiogénèse via le VEGF, à stimuler la prolifération des cellules tumorales et à supprimer l'immunité anti-tumorale (Trinchieri, 2012).

#### d. NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription régulé par I $\kappa$ B dans des conditions normales. Dans un environnement inflammatoire, I $\kappa$ B est phosphorylé puis dégradé, permettant une translocation dans le noyau de NF- $\kappa$ B où il va induire la transcription de ses gènes cibles dont le TNF- $\alpha$ , Cox-2, NOS-2 (Nitric Oxyde Synthase-2) ainsi que des gènes du cycle cellulaire. L'augmentation de ces gènes a pour conséquence une augmentation de la prolifération des cellules, essentielle pour la croissance tumorale (Schetter, Heegaard, and Harris, 2010). De façon indirecte, l'activation de NF- $\kappa$ B induit aussi d'autres changements aux effets pro-tumoraux en rendant les cellules plus résistantes à l'apoptose et à la nécrose et en stimulant l'angiogénèse via la production de VEGF. Chez la souris, l'inhibition de NF- $\kappa$ B diminue l'incidence des cancers dans des modèles inflammatoires du cancer du foie et du colon (Greten et al., 2004; Pikarsky et al., 2004).

## e. Les autres molécules liant inflammation et cancer

### i. miR-155

miR-155 est un miRNA hautement exprimé dans les cellules de l'immunité innée et fonctionne également comme un oncogène. L'expression de miR-155 est augmentée dans plusieurs cancers humains (sein, poumon et colon) et sa surexpression dans les cellules hématopoïétiques de souris induit des désordres prolifératifs et des lymphomes (Costinean et al., 2006). Une inflammation chronique est capable d'augmenter l'expression de miR-155 qui favorise alors les mutations de l'ADN et diminue ses mécanismes de réparation. Ces résultats laissent penser que miR-155 pourrait être l'un des liens entre inflammation chronique et oncogenèse (Tili et al., 2011).

### ii. HIF-1

HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor) est exprimé lors d'inflammations chroniques et aiguës, son taux basal de transcription est augmenté par l'IL-1 $\beta$  et certaines molécules bactériennes comme le LPS. C'est un facteur de transcription hétérodimérique qui régule la transcription de plusieurs gènes en réponse à un stress hypoxique afin de faciliter l'adaptation et la survie pendant une hypoxie, condition fréquemment retrouvée au sein d'une tumeur, en augmentant l'angiogenèse (Scholz and Taylor, 2013). HIF-1 joue également un rôle dans la différenciation des lymphocytes T CD4 en régulant la balance Treg/Th17. Dans les Th17, il augmente la transcription de ROR $\gamma$ T (RAR-related Orphan Receptors) puis forme un complexe avec P300, ROR $\gamma$ T et STAT3 pour induire l'expression d'IL-17 et ainsi augmenter la différenciation Th17. Dans les Treg, HIF-1 se fixe à FoxP3 et le dirige vers le protéasome où il est dégradé, il inhibe donc la différenciation Treg (Dang et al., 2011).



### iii. HER2

La molécule HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), exprimée dans environ 25% des cancers du sein. Son expression est un marqueur de mauvais pronostic. HER2 provoque la transcription d'IL-6, CXCL8, ou encore COX2, mettant ainsi en place un environnement inflammatoire. L'IL-6 produite mène à la phosphorylation de STAT3 comme vu précédemment (Hartman et al., 2011).

## 6. Echappement tumoral et immunosuppression

### a. Les mécanismes d'échappement

Afin d'échapper au système immunitaire, les cellules tumorales sont capables de développer différents mécanismes. Ces mécanismes concernent la cellule tumorale elle-même ou son environnement. Si les cellules tumorales sont peu reconnues par le système immunitaire de par leur statut de cellules du soi, elles vont malgré tout mettre en œuvre des mécanismes leur permettant de devenir invisibles aux yeux du système immunitaire. La perte de sensibilité à l'IFN- $\gamma$  des cellules cancéreuses leur permet d'avoir moins de CMHI à leur surface et les mutations provoquent souvent un défaut dans la présentation de l'antigène (perte de TAP1 et TAP2 (Transporter associated with Antigen Processing)), diminuant ainsi la présentation antigénique et leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. L'instabilité génétique des tumeurs leur permet également de perdre l'expression des antigènes tumoraux et des ligands pour les récepteurs NKG2D. Le système immunitaire, inné comme acquis, n'a alors plus aucun moyen de détecter les cellules tumorales (Poschke, Mougiakakos, and Kiessling, 2011).

La diminution de l'expression de molécules n'est pas le seul moyen mis en œuvre par les cellules tumorales, elles peuvent aussi augmenter l'expression de molécules inhibitrices et de cellules immunosuppressives, par exemple, PD-L1. PD-L1 est normalement retrouvé sur les cellules présentatrices de l'antigène, et sa liaison avec PD-1, présent sur les lymphocytes T activés, limite l'activité de ces lymphocytes. Une augmentation de l'expression de PD-L1 est couramment

retrouvée sur les cellules tumorales, ce qui leur permet d'inhiber la réponse anti-tumorale mise en place par les lymphocytes infiltrant la tumeur, qui expriment pour la majorité PD-1 (Topalian, Drake, and Pardoll, 2012).

Les cellules tumorales et les cytokines qu'elles produisent participent à la mise en place de cellules et à la production de molécules immunosuppressives qui vont limiter l'action du système immunitaire contre la tumeur comme décrit ci-après.

## b. Les cellules immunosuppressives

### i. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant le récepteur  $\alpha$  à l'interleukine-2 (CD25) et sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3). Ils sont impliqués dans la maintenance de la tolérance immunitaire, empêchant l'apparition de maladie auto-immune. Cependant, dans un organisme atteint de cancer, les T reg vont se multiplier et vont migrer au site de la tumeur où ils supprimeront l'immunité anti-tumorale via différents mécanismes (Ghiringhelli et al., 2004).

49

---

Il existe deux sous-populations de Treg, les Treg naturels et les Treg induits. Ces deux sous populations se distinguent notamment grâce à leur expression différentielle de la neuropiline 1 (Weiss et al., 2012). Les Treg naturels sont issus du thymus où ils sont sélectionnés grâce à des interactions TCR-CMH-peptide de haute affinité. Ils exercent leur suppression par contact direct en utilisant soit le système Perforin/Granzyme et peuvent ainsi lyser les lymphocytes T effecteurs, soit la molécule CTLA-4 qui interagit avec les molécules de co-stimulation CD80/86 présentes à la surface des cellules dendritiques et qui va diminuer les fonctions activatrices des cellules dendritiques, soit la voie Fas/Fas ligand qui mène à l'apoptose des lymphocytes T effecteurs, soit l'expression de TGF- $\beta$  membranaire (Ghiringhelli et al., 2005) ou encore via la production d'adénosine, à partir d'ATP ou d'ADP (Adénosine Di-Phosphate) par les ectonucleotidases CD39 et CD73, connues pour inhiber les lymphocytes T effecteurs (tableau 1).

Les Treg induits se développent en dehors du thymus souvent lors d'une inflammation chronique, de maladie auto-immune ou de cancer, en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-2. Ils exercent leur suppression en modulant l'environnement cytokinique. La présence du récepteur  $\alpha$  à l'IL-2 à leur surface leur permet d'adsorber cette cytokine indispensable pour la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Barthlott et al., 2005; Hofer, Krichevsky, and Altan-Bonnet, 2012). Ils produisent également les cytokines immunosuppressives TGF- $\beta$  et IL-10 dont les effets seront abordés plus loin.

Dans la plupart des cancers, l'infiltration en cellules Treg est associée à un mauvais pronostic (Ladoire, Martin, and Ghiringhelli, 2011); cependant et de façon surprenante, de multiples études ont montré que chez l'homme, un haut pourcentage de lymphocytes T exprimant FoxP3 infiltrant la tumeur était de bon pronostic dans les cancers colorectaux, les cancers O.R.L (*oto-rhino-laryngologiques*) et les lymphomes non hodgkiniens (Badoual et al., 2006; Carreras et al., 2006). La capacité des lymphocytes T FoxP3<sup>+</sup> à limiter l'inflammation et les réponses immunitaires anti-microbiennes (Ladoire, Martin, and Ghiringhelli, 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 intra-tumoral de lymphocytes T FoxP3<sup>+</sup> et un pronostic favorable dans ce type de tumeur.

## ii. Les lymphocytes Th17

Le rôle joué par les lymphocytes Th17 dans le cancer est encore très controversé. Les Th17 sont une sous population de lymphocytes T CD4. Ils sont caractérisés par leur expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ T ainsi que par leur expression d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22 (Martin, Apetoh, and Ghiringhelli, 2012). Ils sont générés en présence de TGF- $\beta$ , d'IL-6, d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$  chez la souris et par le TGF- $\beta$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-21 chez l'homme et sont impliqués dans des maladies auto-immunes comme le psoriasis et la sclérose en plaque. Ils seront abordés plus en détails dans la troisième partie de cette introduction.

Dans des organismes atteints de cancer, les Th17 sont retrouvés parmi les lymphocytes infiltrant la tumeur suggérant leur recrutement, induction et prolifération par le microenvironnement tumoral. Les infiltrats immunitaires riches en cellules Th17 ont un rôle ambigu et des résultats contradictoires sont retrouvés en fonction du type de cancer.

Plusieurs études ont montré que les Th17 pouvaient avoir des effets anti-tumoraux. Leur production d'IL-21 augmente les fonctions anti-tumorales des NK et des lymphocytes T CD8 cytotoxiques ainsi que la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  entre autre. La présence de Th17 augmenterait le recrutement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à la tumeur et serait associée avec une croissance tumorale réduite (Nunez et al., 2012) (tableau 1). Le transfert adoptif de Th17 spécifique d'un antigène tumoral dans des souris porteuses de mélanome B16 permet de faire régresser les tumeurs. Ce phénomène est en grande partie dû à la production d'IFN- $\gamma$  par des Th17 exprimant un phénotype mixte Th17/Th1 et co-exprimant les facteurs de transcription spécifiques des lignées Th1 et Th17, T-bet et ROR $\gamma$ t respectivement. La littérature laisse penser qu'en fonction du contexte cytokinique, il existe 2 types de Th17 : les cellules générées en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-6 qui expriment CD39 et CD73, qui n'expriment ni T-bet ni ne produisent d'IFN- $\gamma$  et qui seraient immunosuppresseurs ; à l'inverse, il existe des cellules Th17 générées en présence d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-23, qui produisent de l'IFN- $\gamma$  et expriment T-bet, ces cellules seraient alors des cellules effectrices inflammatoires et antitumorales (Figure 14).

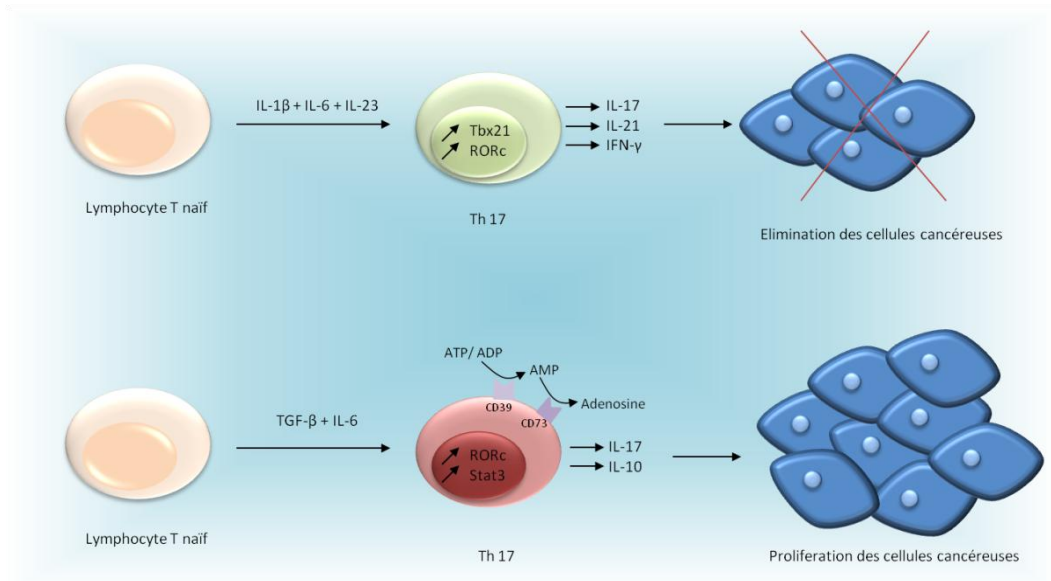


Figure 14: Impact de l'environnement cytokinique sur la polarisation Th17 et conséquences sur les cellules cancéreuses.

Les T naïfs polarisés en Th17 en présence d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-23 vont produire de l'IL-17, de l'IL-21 et de l'IFN- $\gamma$ , ils présentent un phénotype mixte Th17/Th1 et vont être anti-tumoraux. A l'inverse, lorsque la polarisation se fait en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-6, les Th17 produisent de l'IL-17 et de l'IL-10 et expriment à leur surface les ectonucléotidases CD39 et CD73, qui transforment l'ATP en adénosine. Leur production d'IL-17, d'IL-10 et d'adénosine a des effets pro-tumoraux.

La plasticité des Th17 se manifeste également par leur capacité à se différencier en Treg en fonction du microenvironnement cytokinique. La balance entre Treg et Th17 est ainsi contrôlée par la balance entre TGF- $\beta$  et IL-6, une forte concentration de TGF- $\beta$  induit des Treg, tandis que la présence d'IL-6 en plus du TGF- $\beta$  fera pencher la balance du côté Th17.

L'IL-17A est principalement responsable des propriétés pro-tumorales des Th17. L'exposition prolongée à de faibles doses d'IL-1 $\beta$ , comme retrouvées dans certaines inflammations chroniques, augmente la production d'IL-17 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Bruchard et al., 2013). Elle augmente la production de VEGF et d'autres facteurs proangiogéniques par les cellules tumorales et les fibroblastes, permettant la création de nouveaux vaisseaux sanguins pour alimenter la tumeur. Elle promeut également la lymphangiogenèse, pendant laquelle des vaisseaux lymphatiques se développent favorisant la colonisation par les métastases des ganglions lymphatiques. Par ailleurs, l'IL-17 peut directement favoriser la prolifération de cellules tumorales ou la résistance à l'apoptose (Mantovani, 2010). Cependant, l'IL-17 présente également un rôle

ambivalent dans le contrôle de la croissance tumorale. En effet, suivant l'immunogénicité de la tumeur et le rôle potentiel des lymphocytes T CD8, l'IL-17 peut avoir un effet pro-tumoral (Tartour et al., 1999) ou anti-tumoral (Benchetrit et al., 2002).

Tout comme les Treg, les Th17 présentent à leur surface les ectonucléotidases CD39 et 73 qui transforment l'ATP et l'ADP relargués par les cellules mourantes en adénosine, puissante molécule immunosuppressive (Chalmin et al., 2012).

### iii. Les MDSC

Les MDSC sont des cellules myéloïdes immatures qui peuvent se différencier en cellules dendritiques, en macrophages ou en neutrophiles. Si elles sont présentes à très faible pourcentage chez l'homme comme chez le rongeur en l'absence de pathologie, leur population augmente en cas d'infection aigue (comme le choc septique), chronique (comme la tuberculose), de transplantation (Dilek et al., 2012; Dugast et al., 2008) ou de cancer. Des facteurs sécrétés par la tumeur, tel que le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), sont impliqués dans l'expansion des MDSC et l'activation des fonctions immunosuppressives est dépendante de multiple signaux proinflammatoires dont la stimulation du récepteur TLR2. Le développement des MDSC est dépendant des protéines S100A8 et S100A9 dont l'expression empêche la différenciation des progéniteurs myéloïdes, ce qui induit une accumulation de MDSC (Cheng et al., 2008).

Le facteur de transcription C/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer Binding Protein) est responsable du potentiel immunosuppressif des MDSC. Son absence dans les cellules myéloïdes permet le traitement du cancer après un transfert de lymphocytes T CD8 spécifiques de la tumeur, ce qui laisse entrevoir son rôle dans la mise en place d'un environnement immunosuppressif (Marigo et al., 2010). Ces signaux sont pour la plupart dépendants de l'activation du facteur de transcription STAT3. Dans le microenvironnement tumoral, les MDSC peuvent entre autre se différencier en macrophages M2 ou M1 (Ma et al., 2011).

Chez la souris, les MDSC sont caractérisées par les marqueurs Gr-1 et CD11b. Le récepteur CD11b (Mac-1) est une intégrine  $\alpha$ M qui est exprimée sur la

surface des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques, des granulocytes, et des lymphocytes B et T activés. Le Gr1 est un antigène présent sur les cellules précurseurs de la lignée myéloïde qui possède deux épitopes, Ly6C et Ly6G. Ces deux épitopes permettent de distinguer deux sous-populations de MDSC, les MDSC granulocytiques qui sont CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>hi</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low/mid</sup> et les MDSC monocytiques qui sont CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>mid</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup> (Hestdal et al., 1991). Les cellules Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> représentent environ 30-40% des cellules normales de la moelle osseuse et seulement 2-4% des splénocytes nucléés.

Des marqueurs différents sont utilisés pour analyser les sous-types de MDSC chez l'homme. Les MDSC humaines sont principalement définies comme CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>neg/low</sup> et peuvent être divisées en une population granulocytaire CD14<sup>-</sup> et une population monocytaire CD14<sup>+</sup> à l'instar des deux principaux sous-types retrouvés chez la souris. Le récepteur  $\alpha$  à l'interleukine 4 (Mandrizzato et al., 2009), le récepteur au VEGF (Rodriguez et al., 2009), CD15 (Dietlin et al., 2007) et CD66b ont été proposés pour être des marqueurs plus spécifiques des MDSC humaines, cependant ces marqueurs ne sont pas tous retrouvés sur toutes les sous-populations de MDSC. La diversité des marqueurs proposés pour l'identification des MDSC illustre la complexité de cette population.

L'immunosuppression médiée par les MDSC n'est pas seulement dépendante de leur expansion, mais également de leur activation. Celle-ci a lieu grâce à des facteurs produits par le microenvironnement tumoral et par les lymphocytes T, dont le TGF- $\beta$ , l'IL-4 ou l'IL-13, mais aussi par le complément. Ces facteurs déclenchent des voies de signalisation dans les MDSC mettant souvent en jeu les facteurs de transcription STAT.

Les MDSC granulocytiques représentent environ 80% des MDSC en cas de cancer, elles suppriment la réponse des CD8<sup>+</sup> spécifiques à un antigène principalement via la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les MDSC monocytiques grâce à deux enzymes, l'iNos et l'arginase 1, vont diminuer la quantité de L-arginine disponible en la transformant soit en NO et citrulline soit en urée et L-ornithine respectivement (Movahedi et al., 2008). La L-arginine est nécessaire à la génération du CD3 $\zeta$ , partie essentielle du TCR. La diminution de la quantité de L-arginine disponible joue sur l'expression du CD3 $\zeta$  et donc sur la

formation d'un TCR fonctionnel ainsi que sur la prolifération des lymphocytes T. Les MDSC produisent également des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-6, l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , qui sont essentielles à la génération de Treg, Tr1 et de Th17 (tableau 1).



	cellule	molécule	cible	effet	
Effets négatifs	nTreg	Perforine/Granzyme	T effecteurs	lyse	
		CTLA4 sur CD80 et CD86	cellules dendritiques	diminution des fonctions activatrices	
		Fas/FasL	T effecteurs	apoptose	
		Adénosine	T effecteurs	inhibition de la production de cytokines	
		TGF-β	Th17	apparition de CD39 et CD73	
	iTreg	capture IL-2	T effecteurs	diminution de la prolifération	
		IL-10	NK, cellules dendritiques, macrophages	diminution de CD80 et CD86	
		TGF-β	Th17	apparition de CD39 et CD73	
	Th17	IL-17a		augmentation angiogenèse et lymphangiogenèse	
		adénosine	T effecteurs	inhibition de la production de cytokines	
	MDSC	ROS	T CD8	TCR non fonctionnel	
		iNOS/ arginase sur L-arginine	T effecteurs	TCR non fonctionnel	
		IL-6	MDSC	activation des fonctions immunosuppressives	
		IL-10	NK, cellules dendritiques, macrophages	diminution de CD80 et CD86	
		TGF-β	Th17	apparition de CD39 et CD73	
Effets positifs	T reg		Th17	diminution de la production d'IL-17	
			T CD4	limite inflammation limite réponse antimicrobienne	
	Th17	IL-21	NK	T CD8 cytotoxiques	augmentation des fonctions anti-tumorales
			T effecteurs		augmentation de la production d'IFN-γ et de TNF-α
		CXCL9, CXCL10, CXCL11	T CD4	augmentation du recrutement à la tumeur	
				diminution de la croissance tumorale	
		IFN-γ	T effecteurs	diminution de la croissance tumorale	

Tableau 1: Effets négatifs et positifs des principales cellules immunosuppressives.

### c. Les cytokines à potentiel immunosuppresseur

#### i. Le TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est une cytokine notamment produite par les Treg, c'est un puissant inhibiteur de prolifération jouant un rôle central dans le maintien de l'homéostasie des cellules épithéliales, endothéliales et hématopoïétiques. Chez l'Homme, sa présence à des stades précoces dans différents cancers bloque la croissance des cellules cancéreuses (Connolly and Akhurst, 2011). Cependant, une fois que les cellules cancéreuses ont échappé aux systèmes de contrôle de prolifération dépendants du TGF- $\beta$ , cette cytokine va aider l'invasion de nouveaux tissus et la progression de la tumeur. Sa présence participe à la mise en place de populations immunosuppressives, il attire les macrophages dans la tumeur (Byrne, Knox, and Halliday, 2008), les fait dériver en macrophages de type 2 (immunosuppresseurs) et stimule leur sécrétion de cytokines dont l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . Il est également indispensable à la génération de lymphocytes Tr1 et à la prolifération des Treg (Flavell et al., 2010). En présence d'IL-6, il va polariser les T CD4 naïfs en Th17. La présence de TGF- $\beta$  induit également l'expression de CD39 et CD73 sur les lymphocytes T CD4 et CD8, les DC (Cellules Dendritiques) et les macrophages provoquant une production d'adénosine (Regateiro et al., 2011).

#### ii. L'IL-10

L'IL-10 est une cytokine majeure dans l'immunosuppression tumorale. Cette cytokine anti-inflammatoire peut être sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les mastocytes, les lymphocytes B ou les lymphocytes T CD4, principalement les Treg en cas de cancer (O'Garra and Vieira, 2004). L'IL-10 supprime la production d'IFN- $\gamma$  par les NK ainsi que de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF- $\alpha$ ) par les cellules dendritiques et les macrophages (Moore et al., 2001). L'absence d'IL-12 limite la différenciation Th1, limitant ainsi les réponses anti-tumorales liées à cette population. L'IL-10 fait également diminuer les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 à la surface des cellules présentatrices de l'antigène et donc la capacité de ces cellules à activer les lymphocytes T. Elle a néanmoins un effet positif sur la différenciation et la

migration des lymphocytes T cytotoxiques (Moore et al., 2001) et elle active les lymphocytes B en augmentant leur expression du CMH II induisant une plus grande production d'IgA (Itoh and Hirohata, 1995).

### iii. La PGE2

La PGE2 est une molécule dérivée de l'acide arachidonique produite par les cellules myéloïdes, stromales ou par les cellules tumorales grâce à la cyclooxygénase 2 (COX2) et la PG synthase. Les récepteurs à la PGE2, EP-1 à EP-4, sont présents sur de multiples types cellulaires, reflétant le caractère ubiquitaire de cette molécule. Elle est entre autre impliquée dans l'hématopoïèse, la régulation de la pression sanguine et la signalisation neuronale. Si la PGE2 permet l'attraction et l'activation des neutrophiles, des macrophages et des DC, elle induit également la production d'IL-10 par les macrophages et les DC (Kalinski et al., 1997) et supprime les fonctions cytolytiques des NK ainsi que leur production d'IFN- $\gamma$  (Mailliard et al., 2005), influençant directement les réponses anti-tumorales des Th1 et des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. A haute dose, la PGE2 bloque la production d'IL-2 nécessaire à l'expansion et à l'activation des lymphocytes T. A faible dose, elle va moduler la polarisation des T CD4, favorisant la polarisation Th2 et Th17 (Kalinski, 2012).

### iv. L'IL-6

Les IL-6 et IL-1 $\beta$  sont des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-6 est produite par les monocytes, les macrophages et parfois par les cellules tumorales et elle joue un rôle essentiel dans le développement tumoral. L'IL-6 favorise la prolifération des cellules tumorales en stimulant l'angiogenèse et donc la vascularisation de la tumeur (Dankbar et al., 2000) (Figure 15).

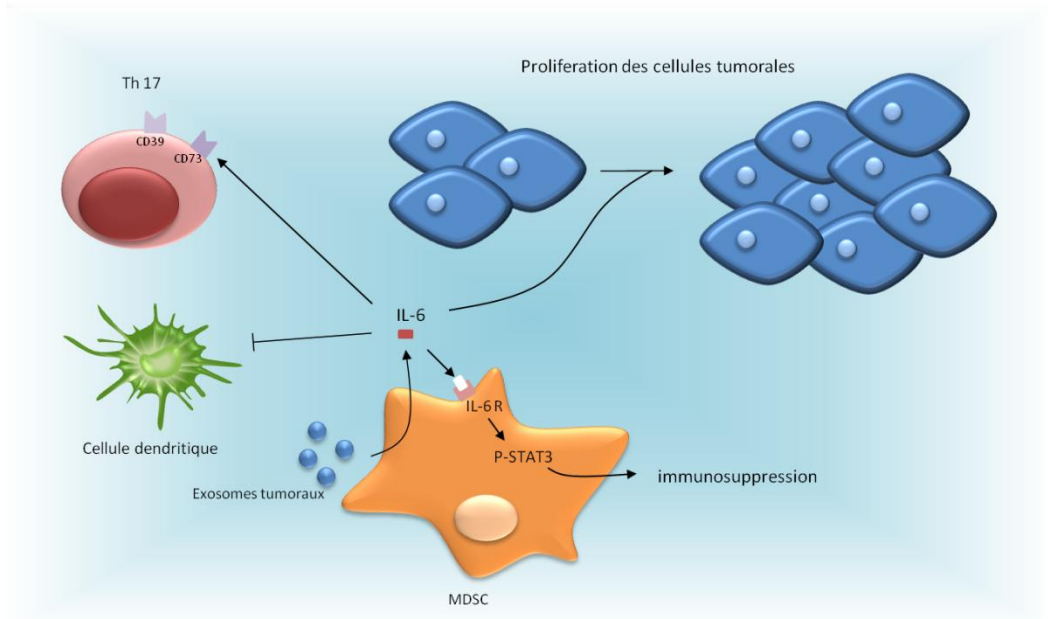


Figure 15: Les divers rôles pro-tumoraux de l'IL-6.

L'IL-6 est produite après stimulation de TLR2 à la surface des MDSC par des exosomes tumoraux. Cette IL-6 va induire l'expression des ectonucléotidases à la surface des Th17, aider la prolifération des cellules tumorales en stimulant l'angiogenèse et va de façon autocrine induire la phosphorylation de STAT3 menant au potentiel immunosuppresseur des MDSC. L'IL-6 va également inhiber la différenciation des cellules dendritiques à partir des précurseurs CD34<sup>+</sup>.

L'IL-6 est aussi impliquée dans la résistance de certaines cellules cancéreuses à la chimiothérapie grâce à l'activation de Stat3 menant à l'augmentation de différentes protéines anti-apoptotiques (Pu et al., 2004). Chez la souris, les exosomes issus de la tumeur vont activer la voie TLR2/MyD88, induisant une production d'IL-6 par les MDSC. Cette IL-6 agit de manière autocrine sur les MDSC et induit la phosphorylation de Stat3 qui est responsable du potentiel immunosuppresseur des MDSC (Chalmin et al., 2010). Pour les lymphocytes Th17, la présence d'IL-6 au moment de leur différenciation influence l'expression à leur surface des ectonucléotidases CD39 et CD73, qui jouent un rôle essentiel dans l'immunosuppression via leur production d'adénosine (Chalmin et al., 2012). Chez l'homme, il a été montré qu'elle pouvait bloquer la maturation des cellules dendritiques (Menetrier-Caux et al., 1998). De plus, le niveau d'IL-6 retrouvé dans le sérum de patients atteints de cancer colorectal a été associé avec la taille de la tumeur, la progression tumorale ainsi qu'à une survie plus courte (Nikiteas et al., 2005).

## v. L'IL-1 $\beta$

L'IL-1 $\beta$  est principalement produite par les macrophages et les DC. Elle est clivée dans sa forme active par la caspase-1, elle-même activée principalement lors de la formation d'un complexe macromoléculaire appelé inflammasome. L'action de l'IL-1 $\beta$  sur le système immunitaire va dépendre de son profil d'expression. Une inflammation aiguë, lors de laquelle de grandes quantités d'IL-1 $\beta$  sont produites pendant une durée limitée, augmente la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8 et favorise donc une immunité anti-tumorale (Ghiringhelli et al., 2009). A l'inverse, une production d'IL-1 $\beta$  modérée mais continue, comme retrouvée lors d'une inflammation chronique, va induire l'expansion des MDSC (Bunt et al., 2007), ainsi que le développement et la multiplication des Th17, favorisant ainsi le développement de populations immunosuppressives et donc une réponse immunitaire non optimum favorisant la croissance tumorale (Bruchard et al., 2013) (Figure 16).

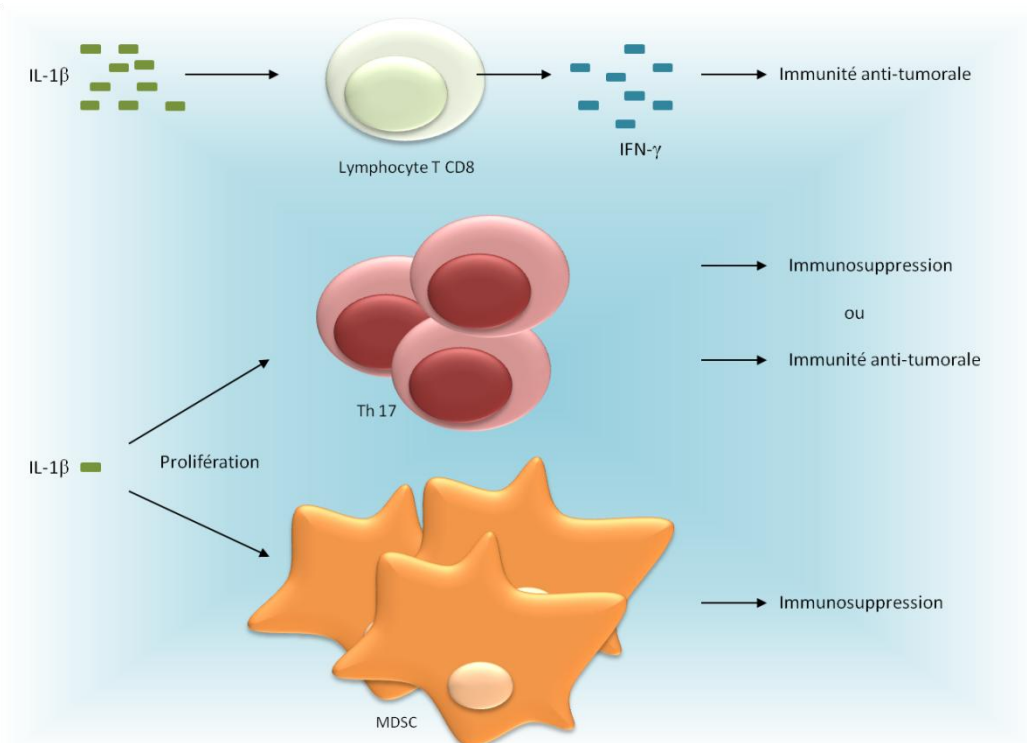


Figure 16 : Effets dose-dépendants de l'IL-1 $\beta$ .

A forte dose, comme retrouvée lors d'une inflammation aiguë, l'IL-1 $\beta$  augmente la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8 provoquant une réponse immunitaire anti-tumorale. A l'inverse, une production faible mais prolongée d'IL-1 $\beta$  induit une prolifération des Th17 et des MDSC immunosuppressifs. Suivant les cytokines présentes lors de leur différenciation, les Th17 seront pro ou anti-tumoraux.

## vi. L'IL-4 et l'IL-9

L'IL-4 est une cytokine de 30kDa produite par les lymphocytes Th2, les mastocytes et les basophiles. Dans le cancer, la production d'IL-4 est néfaste via différents mécanismes. Les lymphocytes T CD8 naïfs expriment moins de CD8, sont moins cytotoxiques et ont une activité anti-tumorale moindre quand ils sont activés en présence d'IL-4 (Olver et al., 2013). L'IL-4 augmente également, *in vitro*, la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses comme des cellules de cancer du colon, du sein, des ovaires ou encore de la prostate (Hallett, Venmar, and Fingleton, 2012). De plus, l'IL-4 induit la différenciation des monocytes en macrophages de type M2, qui ont une activité pro-tumorale (De Palma, 2012).

L'IL-9 a été décrite pour la première fois à la fin des années 80, elle est principalement produite par les lymphocytes Th2, Th17 et Treg, les NK et les mastocytes. Le rôle de l'IL-9 dans le cancer est encore ambigu. Il a été rapporté que l'IL-9 favorise la croissance des mastocytes et augmente les fonctions immunosuppressives des Treg (Feng et al., 2011; Smith et al., 2011), jouant ainsi un rôle pro-tumoral. Cependant, l'IL-9 est également capable de provoquer une réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8 contre la tumeur en augmentant le recrutement des cellules dendritiques via l'induction de l'expression de CCL20 au niveau de la tumeur (Lu et al., 2012b), jouant ainsi un rôle anti-tumoral. Comme pour de nombreuses autres cytokines (IL-17, IL-1 $\beta$ ...), les effets de l'IL-9 dans le cancer sont dépendants de multiples facteurs et ne peuvent être réduits à une simple affirmation.

## C. Le système immunitaire adaptatif

### 1. Généralités

Le système immunitaire adaptatif est composé des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> et des lymphocytes B. Tous sont issus de cellules souches pluripotentes hématopoïétiques, se situant dans la moelle osseuse. Le développement des lymphocytes B se déroule presque exclusivement dans la moelle osseuse quand celui des lymphocytes T a principalement lieu dans le thymus. Sous l'influence de l'expression de facteurs de transcription tel que IKAROS (Schmitt et al., 2002), les cellules souches hématopoïétiques deviennent des progéniteurs lymphocytaires communs aux cellules B et T. La séparation entre cellules B et T a lieu lors de l'expression d'autres facteurs de transcription, EBF, E2A et Pax5 pour les lymphocytes B et Notch1 et Gata3 pour les lymphocytes T (Souabni et al., 2002) (Figure 17).

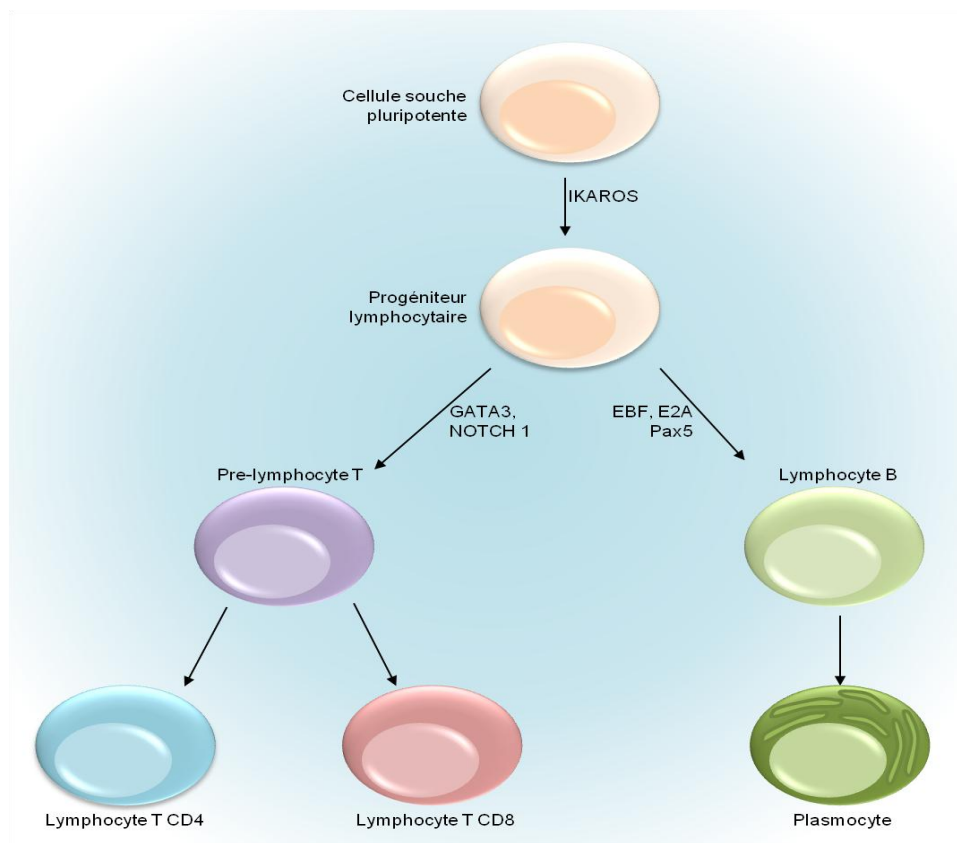


Figure 17 : La différenciation lymphocytaire.

Les cellules souches pluripotentes, sous l'influence de l'expression de facteurs de transcription, dont IKAROS, se transforment en progéniteurs lymphocytaires. L'expression des facteurs de transcription GATA3 et NOTCH1 sont responsables de la formation de pré-lymphocytes T quand l'expression de EBF, E2A et Pax5 induit la formation de lymphocytes B. Les pré-lymphocytes T se séparent ensuite en lymphocytes T CD4 ou en T CD8.

Les lymphocytes possèdent un récepteur, le BCR (B Cell Receptor) pour les lymphocytes B et le TCR (T Cell Receptor) pour les lymphocytes T. La spécificité des lymphocytes pour un épitope peptidique, ou antigène, est déterminée grâce à ces récepteurs. Le réarrangement aléatoire, par les protéines RAG1 (Recombination Activating Gene) et RAG2, des gènes exprimant les protéines constituant ces récepteurs permet une variabilité immense au niveau de l'antigène reconnu et de l'avidité avec laquelle il est reconnu. Chaque lymphocyte est spécifique d'un seul antigène et sa réaction face à cet antigène est contrôlée lors du développement du lymphocyte par deux sélections. La première est positive, elle permet de sélectionner les lymphocytes ayant une réaction pour leur antigène. La seconde est négative, elle permet d'éliminer par apoptose les lymphocytes ayant une trop forte avidité pour des antigènes représentants des molécules du soi. Ce phénomène permet l'élimination de lymphocytes auto-réactifs qui peuvent être source de maladies auto-immunes (Boehm, 2011).

Une fois sortis du thymus, lorsque le lymphocyte rencontre l'antigène pour lequel il est spécifique, il va se différencier et proliférer, permettant la mise en place d'une réaction immunitaire spécifique pour cet antigène. Après avoir maîtrisé et éliminé le pathogène, la majorité des lymphocytes disparaît par apoptose, mais certains évoluent et deviennent des lymphocytes mémoires, qui pourront répondre plus rapidement et plus efficacement lors de la prochaine rencontre avec ce même antigène.

Les lymphocytes T expriment à leur surface la protéine CD4 ou la protéine CD8. CD4 et CD8 permettent la reconnaissance de l'antigène présenté par les CMH de classe II et I respectivement. Les lymphocytes dont le TCR peut lier un antigène présenté par le CMHI garde le CD8 et perdent le CD4 et ceux dont le TCR lie un antigène présenté par le CMHII garde le CD4 et perdent le CD8. Les lymphocytes T CD4 peuvent avoir soit un TCR constitué des protéines  $\alpha$  et  $\beta$  soit des protéines  $\gamma$  et  $\delta$ . Les lymphocytes T CD4  $\gamma\delta$  représentent environ 5% des lymphocytes T et se retrouvent principalement dans la muqueuse intestinale. Les lymphocytes T CD4  $\alpha\beta$  peuvent quant à eux se différencier en plusieurs sous-types sous l'influence de diverses cytokines.



## 2. Les lymphocytes B

Le rôle des lymphocytes B est de produire des immunoglobulines (Ig), ou anticorps. Lorsque le BCR d'un lymphocyte B se lie avec l'antigène pour lequel il est spécifique sans l'aide de cellules présentatrices de l'antigène ou en présence de lymphocytes T, le lymphocyte B s'active et se différencie en plasmocyte producteur d'anticorps. Ces anticorps se fixent sur leur antigène et ce complexe neutralise la bactérie ou le virus sur lequel se trouve l'antigène, l'empêchant d'infecter des cellules, il peut être reconnu par des macrophages ou des neutrophiles qui le phagocyteront ou il peut également activer le système du complément. Après reconnaissance d'un antigène, certains lymphocytes B deviennent des lymphocytes mémoires, avec pour but une réponse plus rapide et efficace lors d'une nouvelle rencontre avec cet antigène (Pieper, Grimbacher, and Eibel, 2013).

## 3. Les lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD8 sont répartis de façon ubiquitaire dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires mais également en périphérie, dans la peau et les muqueuses, principaux sites d'entrée des pathogènes.

Pour s'activer, les lymphocytes T CD8 ont besoin de détecter un antigène présenté par un CMH de classe I à la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène (ou CPA) mais aussi d'un signal de co-stimulation fourni par la liaison des molécules CD80 et CD86, présents sur l'APC, avec CD28 présent sur le lymphocyte. L'absence de ce signal de co-stimulation induit une anergie du lymphocyte et non une réponse efficace. Une fois activé par l'antigène et par la co-stimulation, le lymphocyte se différencie en lymphocyte CD8 effecteur et entre dans une phase d'expansion clonale, caractérisée par une amplification du nombre de lymphocytes T CD8 spécifiques de cet antigène. Un troisième signal est nécessaire pour que la différenciation et l'amplification soient optimales et ce signal est fourni par les cytokines. Des études ont montré qu'en l'absence de cytokines, la réponse CD8 spécifique observée était faible avec une expansion limitée (Albert, Jegathesan, and Darnell, 2001). L'IL-12, l'IL-21 et les IFN de type

I et II sont des cytokines permettant une réponse CD8 efficace (Casey and Mescher, 2007; Curtsinger et al., 2005; Whitmire, Tan, and Whitton, 2005). Ces lymphocytes sont alors capables de reconnaître et de lyser les cellules exprimant à leur surface cet antigène (cellules infectées ou cellules tumorales par exemple). Les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8 proviennent de trois voies : la voie Fas/FasL qui active la formation du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) et provoque l'entrée en apoptose des cellules cibles, la voie perforine/granzyme, qui va littéralement former des pores dans les cellules cibles (Young, Cohn, and Podack, 1986) et la voie TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) qui en se liant à l'un de ces récepteurs induit la mort par apoptose (Smyth et al., 2003).

Une fois les cellules cibles éliminées, les lymphocytes T CD8 effecteurs entrent pour la majorité en apoptose. Seule une faible fraction de cellules (entre 5 à 10%) survit et devient des lymphocytes T mémoires. Certains lymphocytes T CD8 soumis à des stimulations antigéniques chroniques perdent de façon progressive l'expression de CD28 à leur surface tout en restant fonctionnels (Strioga, Pasukoniene, and Characiejus, 2011). Ces lymphocytes T CD8 très expérimentés ne sont alors plus capables de se diviser et entrent en sénescence.

#### 4. Les sous-types de lymphocytes T CD4

Tout comme les lymphocytes T CD8, les lymphocytes T CD4 ont besoin de trois signaux pour devenir effecteurs. Le premier consiste en la liaison du TCR avec un antigène présenté par un CMH de classe II, liaison stabilisée grâce au CD4. Le second signal est le signal de co-stimulation via la liaison de CD28 à CD80 ou CD86 et le troisième signal concerne les cytokines présentes dans le microenvironnement au moment du contact avec l'antigène. Suivant les cytokines présentes, les lymphocytes T CD4 ne se différencieront pas dans le même sous-type, comme nous le verrons par la suite. Comme les autres lymphocytes, la majorité des lymphocytes T CD4 disparaissent par apoptose une fois la cible éliminée et seules quelques cellules perdurent et deviennent mémoires.

Initialement, deux sous-types étaient connus, les lymphocytes Th1 et les Th2, mais cette dichotomie des lymphocytes T CD4 ne parvenait pas à expliquer tous les phénomènes observés. A l'heure actuelle, six sous-types de lymphocytes T CD4  $\alpha\beta$  ont été décrits, les lymphocytes Th1, les Th2, les Th9, les Th17, les Treg (T régulateurs) et les Tfh (T follicular helper) (Figure 18). Leurs effets sont fonction des cytokines qu'ils produisent et qui vont agir sur d'autres cellules, principalement celles du système immunitaire. Ils possèdent peu d'effets cytotoxiques directs (Eljaafari et al., 2001; Hanabuchi et al., 1994; Quezada et al., 2010), à l'inverse des lymphocytes T CD8 et l'un des sous-types, les Treg, est uniquement destiné au contrôle des réponses immunitaires afin d'éviter les réactions auto-immunes.

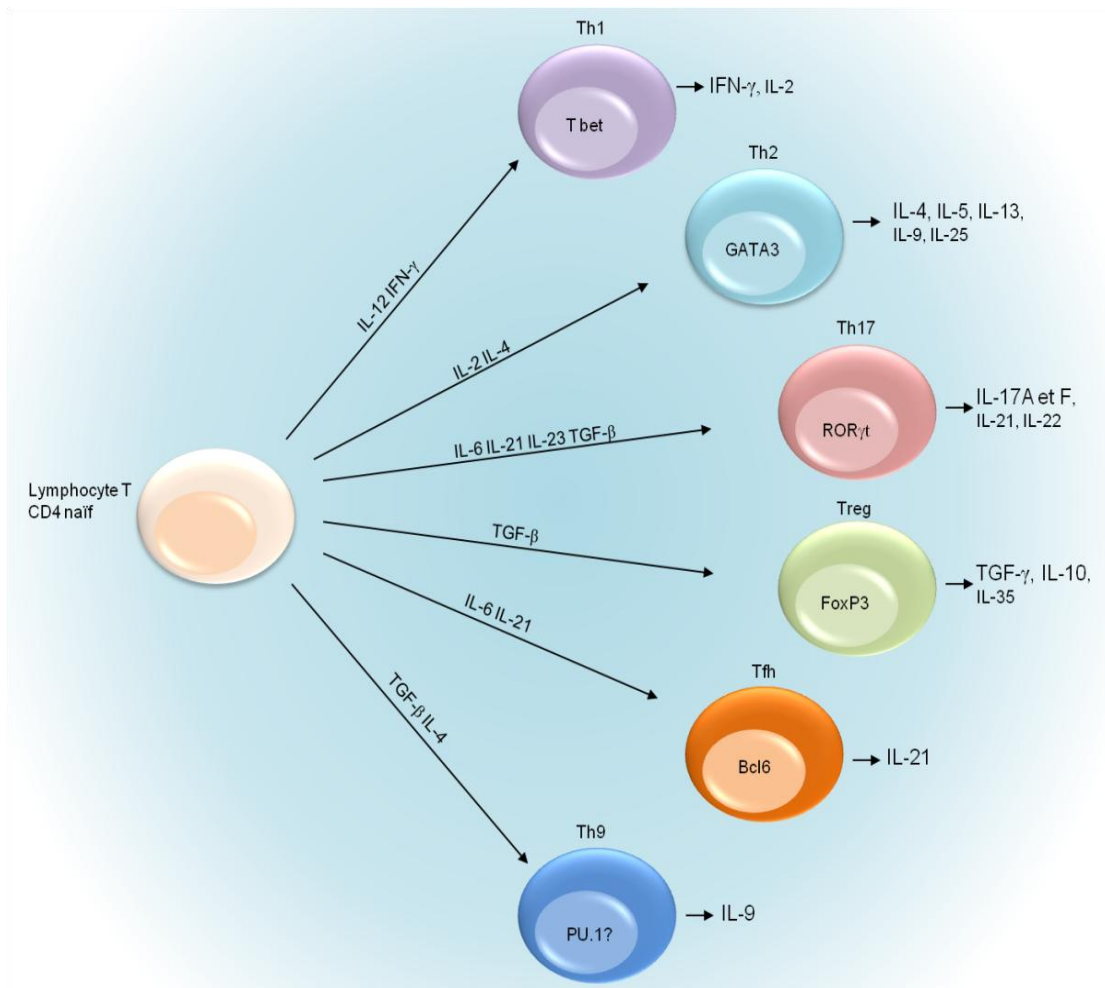


Figure 18 : Les différents sous-types de lymphocytes T CD4.

Après stimulation du TCR d'un lymphocyte T CD4 et co-stimulation via CD28, son évolution vers l'un des différents sous-types est fonction des cytokines présentes. Les différents sous-types sont caractérisés par les cytokines qu'ils produisent et par l'expression d'un facteur de transcription, à l'exception des Th9 pour lequel aucun facteur de transcription n'a encore fermement été identifié.

## a. Les Th1

### i. La différenciation

L'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  sont les cytokines essentielles initiant la cascade de signalisation menant au développement des Th1. L'IL-12 est sécrétée par les APC après leur activation et elle provoque la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK. L'IL-12 se lie à son récepteur sur le lymphocyte non différencié, cette liaison induit la phosphorylation de STAT4. STAT4 migre dans le noyau où il provoque la transcription d'IFN- $\gamma$ . Cet IFN- $\gamma$  agit de manière autocrine et active STAT1. STAT1 induit alors la transcription du facteur T-bet qui va lui aussi induire la transcription d'IFN- $\gamma$  mais également du récepteur à l'IL-12, amplifiant ainsi la différenciation en Th1 grâce à une boucle de rétrocontrôle positif (Figure 19).

T-bet, qui est le facteur de transcription définissant les Th1, est également capable de supprimer le développement des Th2 en inhibant la transcription du gène codant pour l'IL-4 (Djuretic et al., 2007) et en bloquant le facteur de transcription des Th2, GATA3 (GAGA binding protein 3) (Hwang et al., 2005). La différenciation en Th17 est également bloquée par T-bet via son inhibition de la transcription du gène Rorc, qui code pour le principal facteur de transcription des Th17, ROR $\gamma$ T (Lazarevic et al., 2011). T-bet agit en tant que promoteur de la différenciation Th1 en se liant avec et en inhibant les régions promotrices de Socs1 (Suppressor of cytokine signaling 1) et Socs3, des protéines impliquées dans l'inhibition de la signalisation par les cytokines et particulièrement de l'IFN- $\gamma$  (Oestreich, Huang, and Weinmann, 2011). Afin d'éviter une surproduction d'IFN- $\gamma$  qui pourrait provoquer une auto-immunité, T-bet s'associe à Bcl-6 (B cell lymphoma) quand arrive la fin de la différenciation et réprime la transcription de l'IFN- $\gamma$  (Oestreich, Huang, and Weinmann, 2011).

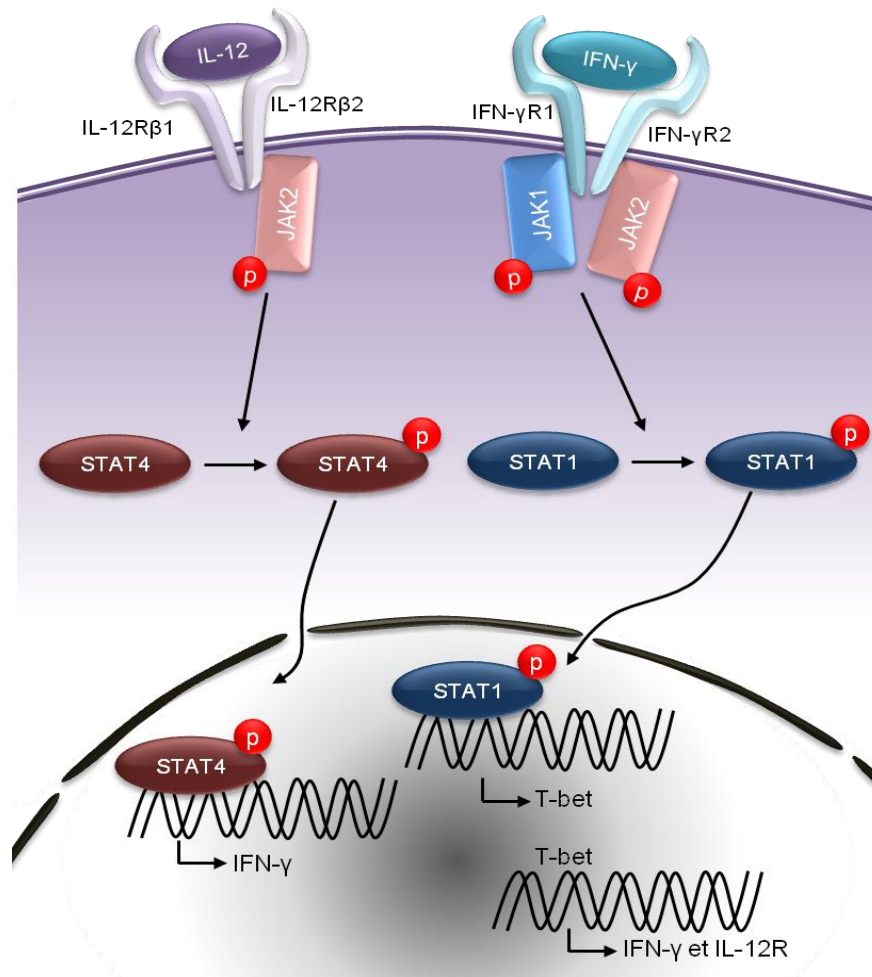


Figure 19 : La différenciation Th1.

L'IL-12, via son récepteur, active la phosphorylation de STAT4 qui peut ensuite activer la transcription de l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  agit de manière autocrine et induit la phosphorylation de STAT1 qui va lui-même activer la transcription de T-bet. T-bet amplifie la différenciation Th1 en induisant l'expression de l'IFN- $\gamma$  et du récepteur à l'IL-12.

## ii. Les fonctions

Les Th1 sont impliqués dans l'élimination des pathogènes intracellulaires. Ils sécrètent principalement de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2. L'IFN- $\gamma$  active les macrophages via STAT1 et augmente leur phagocytose. L'IFN- $\gamma$  active la voie Jak/STAT et influence ainsi plus de 200 gènes (Boehm et al., 1997). L'IFN- $\gamma$  permet également la maturation des cellules dendritiques et améliore ainsi l'efficacité de cette CPA (Pan et al., 2004). L'IL-2 active la prolifération des cellules T et particulièrement des lymphocytes T CD8 (Schroder et al., 2004). L'IFN- $\gamma$  augmente l'expression des TLR sur les macrophages, améliorant ainsi leur

réponse aux ligands des TLR. Il active également NF- $\kappa$ B et diminue la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Hu and Ivashkiv, 2009). L'IFN- $\gamma$  provoque une augmentation des molécules de CMHI à la surface des CPA afin de les aider à présenter l'antigène aux lymphocytes T CD8 (Seliger, Ruiz-Cabello, and Garrido, 2008). De plus, l'IFN- $\gamma$  a des effets anti-prolifératifs, anti-angiogéniques et pro-apoptotiques (Zaidi and Merlino, 2011). Ainsi, les Th1 jouent un rôle indirect mais primordial dans la cytotoxicité des lymphocytes T CD8, entre autre dans le cancer. Cependant, les réponses Th1 doivent être maîtrisées pour éviter des maladies auto-immunes comme le diabète, la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaque (Chen and Liu, 2009) de même qu'une réponse Th1 dirigée contre les antigènes présents sur un organe provenant du donneur, lors d'une greffe, est un obstacle à la réussite de la transplantation.

## b. Les Th2

### i. La différenciation

L'IL-2 et l'IL-4 sont les cytokines majeures de la différenciation Th2. L'IL-2 déclenche une cascade de signalisation qui mène à la phosphorylation de STAT5 via la voie Jak-STAT. STAT5 est activé indépendamment de l'IL-4 et est indispensable à la différenciation Th2. Une équipe a montré que STAT5 se liait au second intron du gène de l'IL-4 et activait sa transcription en association avec GATA3 (Zhu et al., 2003). Plus récemment, une autre équipe a montré que le taux de phosphorylation de STAT5 était corrélé à la quantité d'IL-4 produite, sans en expliquer le mécanisme (Shatynski et al., 2012). Ce point sera abordé en détail dans le second article de cette thèse. L'IL-4 induit la phosphorylation de STAT6 qui migre alors dans le noyau où il augmente l'expression de GATA3, le facteur de transcription majeur des Th2. STAT6 phosphorylé peut également s'associer à IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) et augmenter la transcription du gène codant pour l'IL-4 (Figure 20). IRF4 peut activer le promoteur de l'IL-4 avec une autre protéine, NFATc2 (Nuclear Factor of Activated T cell 2). GATA3 réduit l'expression de STAT4 et inhibe la transcription de l'IFN- $\gamma$  diminuant ainsi la différenciation Th1 (Kaminuma et al., 2004; Usui et al., 2003). De plus, GATA3 est indispensable à la différenciation Th2, son absence mène à l'arrêt de la

différenciation. La voie IL-4/STAT6 induit Gfi-1 (Growth factor independent-1), un répresseur transcriptionnel qui favorise la prolifération des cellules exprimant fortement GATA-3 (Zhu et al., 2006).

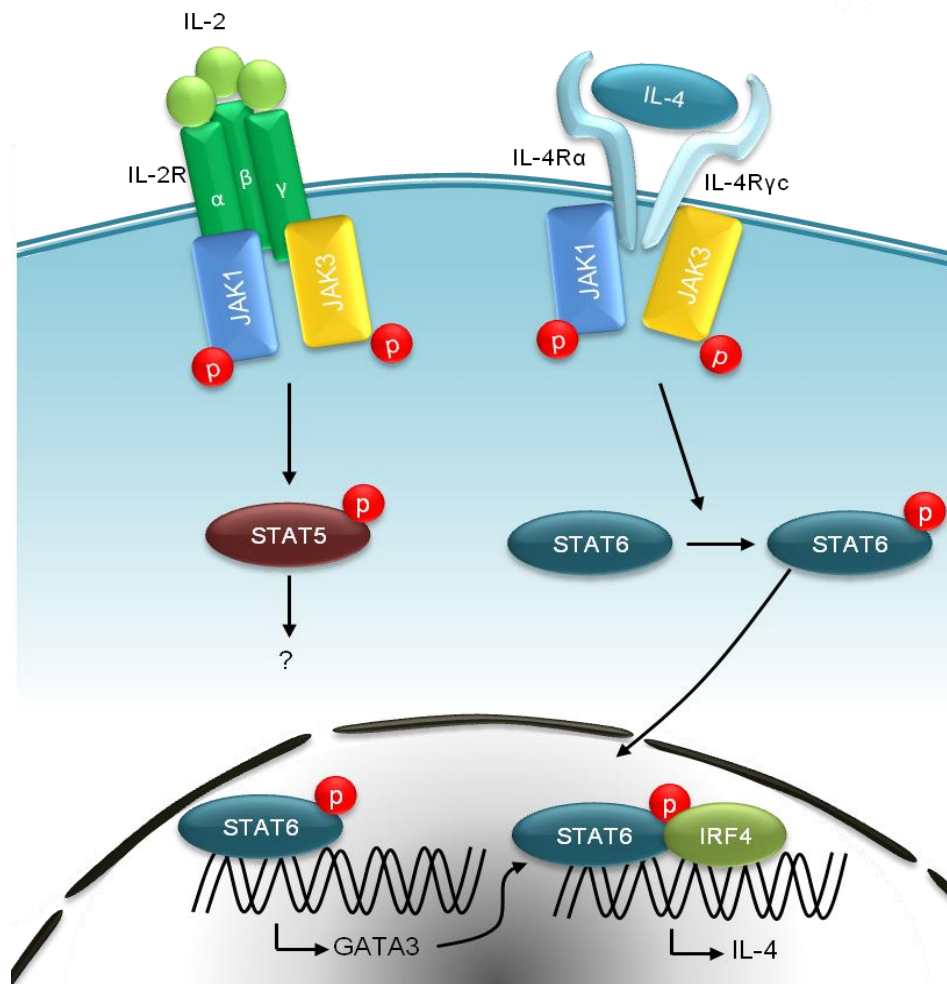


Figure 20 : La différenciation Th2.

L'IL-2 et l'IL-4 activent la phosphorylation de STAT5 et de STAT6 respectivement. Le rôle de STAT5 dans la différenciation Th2 n'est pas encore clairement identifié. STAT6 active la transcription de GATA3 et se lie à IRF4 pour induire la transcription d'IL-4. GATA3 active également la transcription d'IL-4, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive.

## ii. Les fonctions

Les Th2 sont connus pour jouer un rôle important dans la réponse immunitaire contre les parasites extracellulaires, dont les helminthes, ainsi que dans l'induction et la persistance de l'asthme. Les Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, et de l'IL-13 principalement mais aussi de l'IL-9, de l'IL-10 et de l'IL-25. Les Th2

régulent la production d'IgE des lymphocytes B grâce à l'IL-4 (Li, Zhang, and Sun, 2011). L'IgE active les cellules innées du système immunitaire en se liant au récepteur Fc présent sur ces cellules. Les Th2 peuvent également recruter les éosinophiles et les mastocytes grâce à l'IL-5 et à l'IL-9 respectivement. Les Th2 ont probablement des effets sur bien d'autres cellules, les récepteurs à l'IL-4 et à l'IL-13 étant exprimés par de nombreux types cellulaires (Paul and Zhu, 2010). De nombreux cancers expriment le récepteur à l'IL-4 et l'IL-4 a été montrée comme pro-tumorale via sa capacité à augmenter la résistance des cellules tumorales à l'apoptose (Li et al., 2008) et à différencier les macrophages en type 2, connus pour être pro-tumoraux. Les macrophages M2 augmentent l'angiogenèse et suppriment l'immunité anti-tumorale (Mantovani et al., 2008).

### c. Les Th17

#### i. La différenciation

L'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et le TGF- $\beta$  sont les cytokines majeures impliquées dans le développement des Th17. Ces cytokines n'entrent pas en jeu au même moment de la différenciation Th17. Chez la souris, le TGF- $\beta$  et l'IL-6 initient la différenciation, l'IL-21 permet d'amplifier les cellules et l'IL-23 de stabiliser le sous-type Th17.

Le TGF- $\beta$  est également impliqué dans la différenciation des Treg et des Th9. Ses effets sont fonction de sa concentration. A haute concentration, le TGF- $\beta$  induit la différenciation des Treg, alors qu'à faible dose et en présence d'IL-6, il induit des Th17, la production d'IL-21 et augmente l'expression du récepteur à l'IL-23. La signalisation du TGF- $\beta$  ne passe pas par STAT3, à l'inverse des autres cytokines impliquées. Cependant, le TGF- $\beta$  inhibe l'expression de Socs3, induite par l'IL-6 et l'IL-21, et qui régule négativement les voies de signalisation de STAT3 (Qin et al., 2009). En présence d'IL-6, le TGF- $\beta$  mène à l'activation du facteur de transcription ROR $\gamma$ T via la phosphorylation de STAT3 qui agit ensuite comme facteur de transcription sur le gène codant pour ROR $\gamma$ T (Yang et al., 2008). L'expression de ROR $\gamma$ T est clé dans le développement des Th17 et induit la production d'IL-17A et IL-17F. D'autres facteurs de transcription jouent, dans une moindre mesure, un rôle dans la différenciation des Th17, comme Runx1,



AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor), Batf (Basic leudine zipper transcriptional factor ATF-like) ou encore ROR $\alpha$ .

STAT3 est activé par l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23. Sa phosphorylation augmente l'expression de ROR $\gamma$ T et il peut se lier aux promoteurs des gènes codants pour l'IL-17A et F (Luckheeram et al., 2012) (Figure 21). Si l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4 permettent une auto-amplification de leurs sous-types respectifs, Th1 et Th2, ce n'est pas le cas des IL-17A et F, cytokines dont les Th17 tirent leur nom. C'est l'IL-21, dont la production est induite par le TGF- $\beta$ , qui est responsable de l'amplification de la différenciation Th17. L'IL-23, principalement produite par les CPA, est détectée par l'IL-23R sur les Th17 et sert à la multiplication des cellules Th17. L'absence de TGF- $\beta$  peut être compensé par la présence d'IL-1 $\beta$ , cependant, les Th17 obtenus n'auront pas les même fonctions, particulièrement en ce qui concerne leurs capacités immunosuppressives (Chalmin et al., 2012).

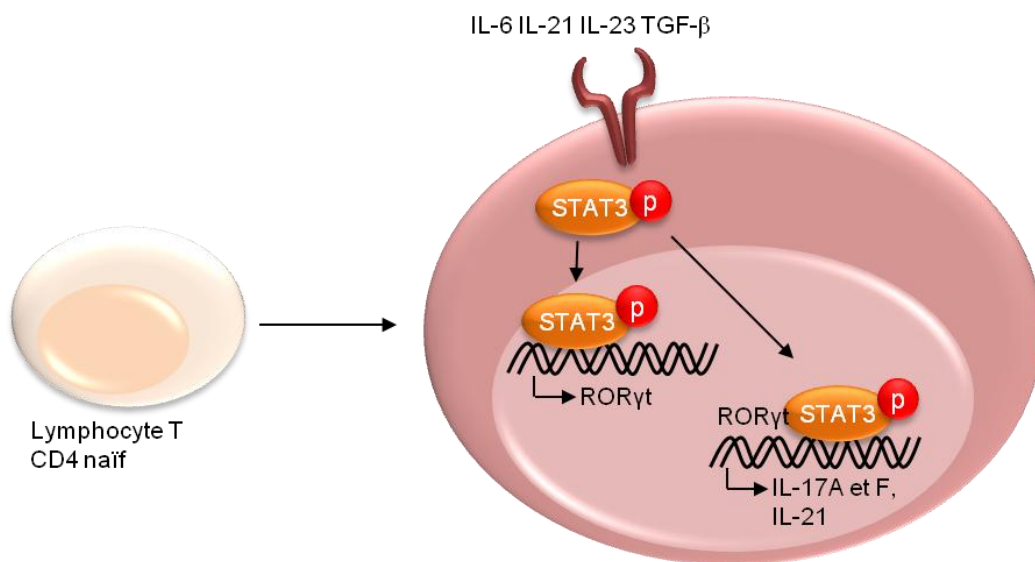


Figure 21 : La différenciation Th17.

L'IL-6 et le TGF- $\beta$  initient la différenciation Th17. Le TGF- $\beta$  induit la production d'IL-21 et la production du récepteur à l'IL-23 et avec l'IL-6, le TGF- $\beta$  active la transcription de RORc. L'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 provoquent la phosphorylation de STAT3 qui, de même que ROR $\gamma$ T, induit l'expression d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-21. La production d'IL-21 permet la mise en place d'une auto-amplification des Th17.

## ii. Les fonctions

Les Th17 sont responsables de l'immunité dirigée contre les bactéries extracellulaires et les champignons. Ils sont également impliqués dans le développement de maladies auto-immunes (Muranski and Restifo, 2013) et dans

l'immunosuppression tumorale (comme vu précédemment). Les principales cytokines sécrétées sont les IL-17A et F, l'IL-21 et l'IL-22. Les IL-17A et F ont le même récepteur, qui est exprimé par de multiples tissus (peau, poumon, intestin...). L'IL-17 induit la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  et augmente l'angiogenèse via le VEGF. L'IL-17 joue une part importante de l'immunosuppression exercée par les Th17. Une étude récente a exploré les capacités immunosuppressives des Th17 dans différentes conditions de polarisation, avec ou sans TGF- $\beta$ . Ils ont découvert que des Th17 polarisés en présence de TGF- $\beta$  exprimaient à leur surface les ectonucléotidases CD39 et CD73, responsables de la production d'adénosine immunosuppressive à partir d'ATP (Chalmin et al., 2012). Cependant, les Th17 ont également des effets positifs, dus à leur production d'IL-21, qui active les lymphocytes T, promeut la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et en cellules mémoires et active les cellules NK (Korn et al., 2007; Leonard and Spolski, 2005).

L'IL-22 participe à la réponse inflammatoire et est importante dans la défense contre les bactéries pathogènes. Dans le cancer du colon, l'IL-22 exerce un rôle protecteur en diminuant la tumorigenèse. Son absence ou sa capture par son récepteur soluble, l'IL-22BP (Binding Protein) résulte en une inflammation et une tumorigenèse augmentées dans un modèle de cancer associé à une colite (Huber et al., 2012). La polarisation de Th17 en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-6 mais en absence d'IL-23 et d'IL-21 conduit au développement de Th17 produisant de l'IL-17 mais aussi et de façon plus surprenante, de l'IL-10 et peu de cytokines inflammatoires. L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive et sa production par des Th17 abolit leurs propres effets pro-inflammatoires, réduisant ainsi la pathogénicité des Th17 (McGeachy et al., 2007).

#### d. Les iTreg

##### i. La différenciation

Les iTreg (inducible Treg) sont caractérisés par l'expression à leur surface de CD25 (la partie  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2) et par le facteur de transcription FoxP3. Il est important de les distinguer des nTreg (natural Treg) qui sortent du thymus déjà différenciés et exprimant FoxP3. Le TGF- $\beta$  est la cytokine responsable de la différenciation en iTreg. La signalisation induite par le TGF- $\beta$  mène à

l'expression de FoxP3 après activation du TCR. Les iTreg produisent alors du TGF- $\beta$  et instaurent une boucle de rétrocontrôle positif augmentant leur différenciation. Les protéines Smad2 et Smad3 sont activées par le TGF- $\beta$  et participent à la différenciation iTreg par leur induction de FoxP3 et pour Smad3, par sa capacité à bloquer ROR $\gamma$ T (Martinez et al., 2009) (Figure 22). L'IL-2, dont l'expression de la sous unité  $\alpha$  de son récepteur est l'une des caractéristiques des iTreg, provoque la phosphorylation de STAT5. STAT5 phosphorylé va alors augmenter l'expression de FoxP3 et entrer en compétition avec STAT3 pour bloquer l'induction de gènes STAT3 dépendants comme l'IL-17 et ainsi promouvoir la différenciation des iTreg. L'activation du TCR provoque l'expression de DNMT1 (DNA (cytosine-5)-MethylTransferase 1) et de DNMT3b, 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 de FoxP3 via l'activation de la voie P38 MAP kinase, permettant la polarisation iTreg (Li, Ebert, and Li, 2013).

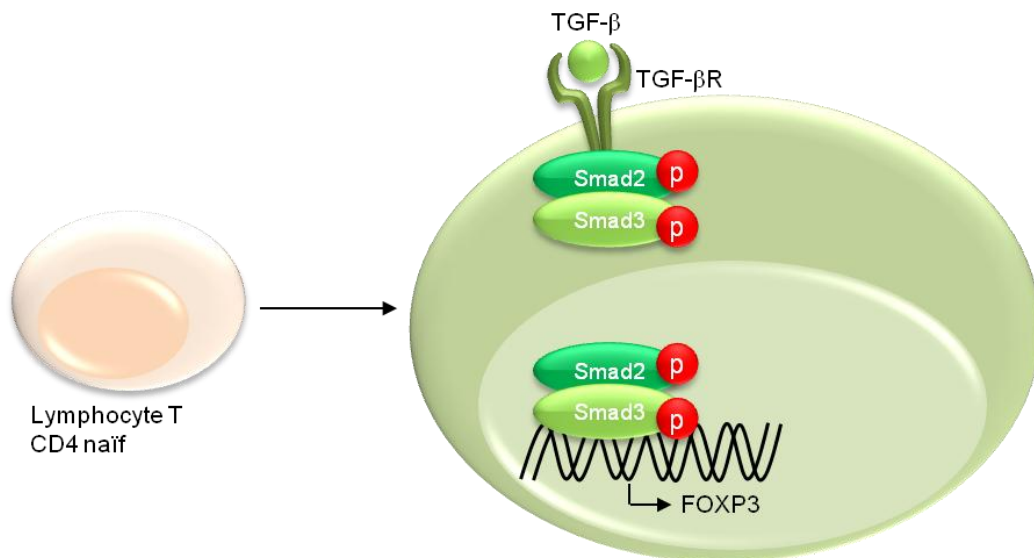


Figure 22 : La différenciation iTreg.

Le TGF- $\beta$ , via Smad2 et Smad3, provoque l'expression du facteur de transcription FoxP3.

Les Tr1 sont un type de Treg induit en périphérie par les cellules dendritiques en présence d'IL-10 autocrine. Cette IL-10 joue un rôle essentiel dans leur différenciation en association avec l'IFN- $\alpha$  produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Les Tr1 sont CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> mais n'expriment pas FoxP3 (Roncarolo et al., 2006).

## ii. Les fonctions

Il existe deux types de Treg, les iTreg, dont nous venons de voir le processus de différenciation et les nTreg, qui sont produits dans le thymus et expriment naturellement FoxP3. Les Treg sont essentiels dans la régulation et le maintien de la tolérance contre les antigènes du soi et envers certains antigènes étrangers. Ils interviennent également après une réponse immunitaire dirigée contre un pathogène et inhibent cette réponse qui n'est alors plus nécessaire et qui pourrait déclencher des maladies auto-immunes. Ils produisent de l'IL-10, de l'IL-35 et du TGF- $\beta$ . L'IL-10 est une cytokine inhibitrice qui supprime les réponses inflammatoires et inhibe l'activité des Th1, des NK et des macrophages, empêchant ainsi les dommages tissulaires liés à l'inflammation (Asseman et al., 1999; Ouyang et al., 2011). Le TGF- $\beta$  et l'IL-10 sont capables de supprimer la production d'IgE et donc d'atténuer l'inflammation liée aux allergènes (Jutel and Akdis, 2008). L'IL-35 est une cytokine découverte récemment, elle supprime la prolifération des lymphocytes T et convertit les lymphocytes T naïfs en iT35, qui sont des pseudo-Treg n'exprimant pas FoxP3 et ne produisant ni TGF- $\beta$  ni IL-10 (Collison et al., 2012; Collison et al., 2007). Les Tr1, après leur génération, ont la capacité de migrer directement au site de l'inflammation où ils vont inhiber les réponses concernant des antigènes non-exprimés dans le thymus grâce à leur forte production d'IL-10 (Roncarolo et al., 2006).

75

---

## e. Les Tfh

### i. La différenciation

L'IL-6 et l'IL-21 sont les cytokines impliquées dans la différenciation des lymphocytes T folliculaires. Elles vont induire la phosphorylation de STAT3 comme dans les Th17, cependant celui-ci ne va pas activer ROR $\gamma$ T à l'inverse de ce qui est observé dans les Th17. L'IL-6 active également STAT1 qui va s'associer à STAT3 pour induire la transcription de Batf qui va lui induire Bcl6. La transcription de la chimiokine CXCR5 est ensuite déclenchée par Bcl6 (Ma et al., 2012) (Figure 23). Bcl6 réprime également l'expression des sous-unités  $\beta$  et

γ du récepteur à l'IL-2 dont la signalisation réprimerait la polarisation Tfh en induisant Blimp1, qui bloque l'expression de Bcl6.

FOXO1 et Socs3 sont également des régulateurs négatifs de la différenciation Tfh. ICOS (Inducible COStimulator), un membre de la famille de CD28, est nécessaire au développement des Tfh mais aussi pour le maintien de l'expression de Bcl6 (Choi, Yang, and Crotty, 2013). Une récente étude a montré l'importance du cluster miR-17-92 dans cette différenciation. Le miR-17-92 empêche l'expression de gènes non-appropriés pour la différenciation Tfh dont Rora, qui code pour RORα, cette régulation a lieu après l'induction de Bcl6 (Baumjohann et al., 2013). Les Tfh produisent l'IL-21 nécessaire à leur polarisation, ils mettent ainsi en place une boucle de rétrocontrôle positif, tout comme les Th1, Th2, et les Th17 avec l'IFN-γ, l'IL-4 et l'IL-21 respectivement.

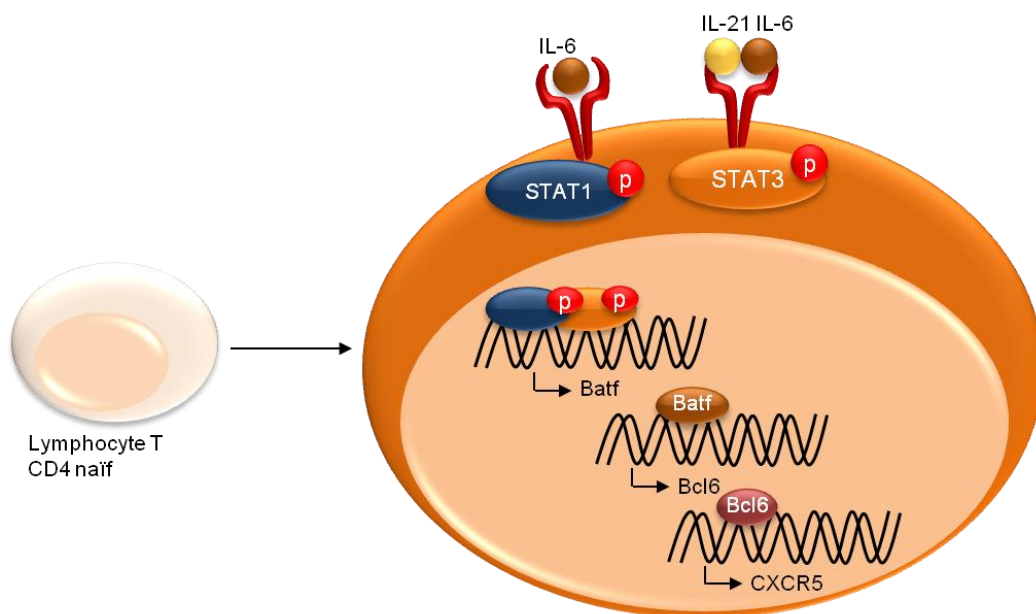


Figure 23 : La différenciation Tfh.

La signalisation des voies de l'IL-6 et de l'IL-21 induit l'activation de STAT1 et de STAT3. Ceux-ci s'associent et agissent comme facteurs de transcription pour le gène codant pour Batf. Batf induit ensuite la transcription de Bcl6 qui lui-même provoque la transcription de la chimiokine CXCR5. La production d'IL-21, via STAT3, permet la mise en place d'une amplification de la différenciation Tfh.

## ii. Les fonctions

L'expression à leur surface de CXCR5 ainsi que la perte de CCR7 permet aux Tfh de sortir de la zone T des centres germinatifs et de se relocaliser dans la zone des cellules B où ils vont participer à l'expansion et à la différenciation des lymphocytes B, entre autre grâce à la production d'IL-21. Les Tfh sont également retrouvés en dehors des centres germinatifs, ceux-ci expriment alors faiblement CXCR5. Leur action en dehors des centres concerne encore les lymphocytes B et leur différenciation et la production d'IL-21 est cruciale dans ce phénomène. Une étude a récemment montré que la présence de Tfh dans les structures lymphoïdes tertiaires localisées en périphérie de cancer du sein était de bon pronostic. Les auteurs supposent que la présence des Tfh dans ces structures les rend plus fonctionnelles et en conséquence, serait importante dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace (Gu-Trantien et al., 2013).

## f. Les Th9

### i. La différenciation

Les Th9 ont d'abord été considérés comme un sous-type de Th2. L'IL-4 déclenche la polarisation Th2 et le TGF- $\beta$  induit des lymphocytes T régulateurs mais l'ajout de TGF- $\beta$  à l'IL-4 fait pencher la différenciation du côté Th9. PU.1, STAT6, IRF4 et GATA3 sont les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation Th9. PU.1 est nécessaire au développement des Th9, il est induit par le TGF- $\beta$  via Smad. PU.1 se lie directement sur le promoteur du gène codant pour l'IL-9 où il recrute des enzymes qui vont modifier la chromatine (acetylation des histones H3 et H4) afin d'augmenter la transcription du gène (Goswami and Kaplan, 2012). Lors de la différenciation, STAT6 est retrouvé phosphorylé à des niveaux similaires à ceux observés dans les Th2, ce qui n'est pas surprenant étant donné l'importance de l'IL-4 dans la différenciation Th9 (Goswami et al., 2012). L'implication de STAT6 dans ce mécanisme pose la question du rôle de GATA3. Celui-ci est bien exprimé au cours de la différenciation et les cellules n'ayant pas GATA3 ne peuvent devenir Th9, cependant, le rôle de GATA3 dans le développement des Th9 reste incertain. IRF4 est également nécessaire aux

Th9 puisque son absence empêche leur différenciation. IRF4 se lie au promoteur du gène codant pour l'IL-9 de façon PU.1 dépendante pour augmenter sa transcription (Figure 24). De nombreux autres facteurs semblent impliqués dans la différenciation Th9, tels que NF- $\kappa$ B, NFAT, Notch ou Smad et peu d'études ont pour l'instant révélé leurs actions (Kaplan, 2013). A l'heure actuelle, aucun facteur de transcription n'est donné pour définir simplement les Th9.

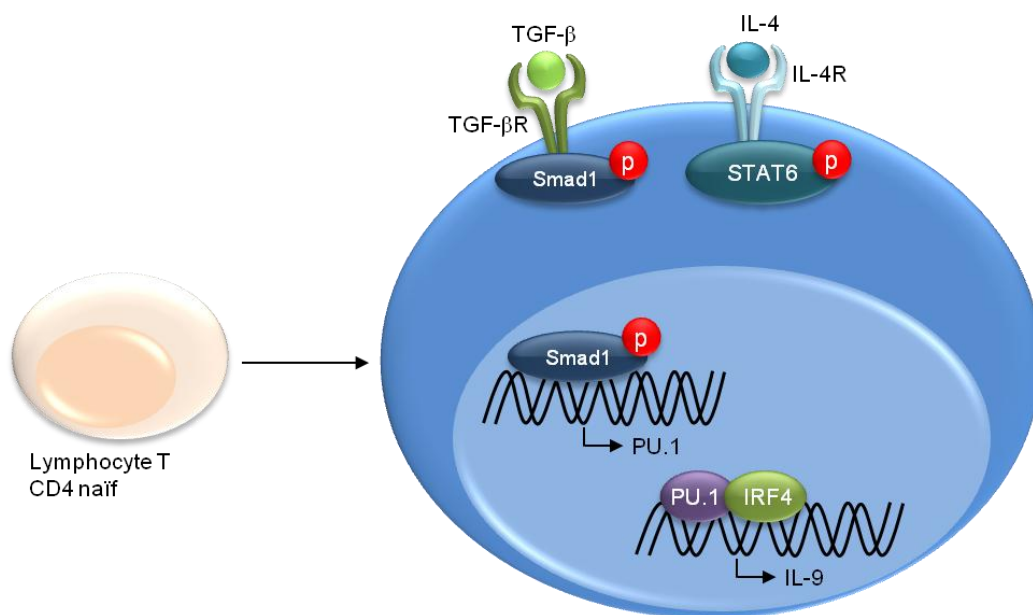


Figure 24 : La différenciation Th9.

La signalisation via le TGF- $\beta$  provoque la phosphorylation et l'activation de Smad1 qui agit ensuite comme facteur de transcription pour le gène codant pour PU.1. IRF4 s'associe à PU.1 pour activer la transcription de l'IL-9. L'IL-4 induit la phosphorylation de STAT6 mais son rôle n'a pas encore été découvert.

## ii. Les fonctions

Les Th9 étant un sous-type découvert récemment, de nombreuses questions se posent encore quand à leurs actions et leurs implications dans diverses maladies. Les Th9 ont été retrouvés chez des patients atteints d'allergies et leur nombre augmente considérablement après une stimulation spécifique par l'allergène (Yao, Tepper, and Kaplan, 2011). Des études sur le rôle des Th9 dans les maladies auto-immunes ont été réalisées, par exemple dans l'EAE

(experimental auto-immune encephalomyelitis) mais les résultats obtenus sont parfois contradictoires (Kaplan, 2013). Dans l'immunité anti-tumorale, les Th9 semblent avoir des effets positifs, des cellules sécrétant de l'IL-9 ont été retrouvées infiltrant les tumeurs et un transfert adoptif de Th9 supprime la croissance de tumeur de mélanome B16 (Purwar et al., 2012).



## D. Les objectifs du travail de thèse

Pendant ces quatre années, mon travail a consisté en l'étude de NLRP3 dans divers types cellulaires dans le contexte du cancer.

J'ai commencé par étudier l'implication de l'inflammasome NLRP3 après traitement de souris porteuses de tumeur par des chimiothérapies. Une étude effectuée précédemment par l'équipe (Vincent et al., 2010) montrait que deux chimiothérapies, le 5-Fluorouracile (5FU) et la Gemcitabine (Gem), sont capables d'éliminer de façon spécifique des cellules immunosuppressives, les MDSC, sans affecter les autres cellules du système immunitaire. L'élimination de cette immunosuppression a pour conséquence une diminution de la taille des tumeurs pendant environ 10 jours puis la croissance de ces tumeurs recommence. Cependant, chez des souris ne possédant pas NLRP3, la reprise de croissance tumorale n'est pas observée, indiquant un rôle négatif de NLRP3 dans la croissance tumorale après traitement par chimiothérapie. Les deux chimiothérapies agissant *a priori* uniquement sur les MDSC, la question du lien entre MDSC et NLRP3 m'a semblée cruciale. La compréhension des phénomènes menant au retour de la croissance tumorale a été au cœur de ce premier projet. Je me suis donc intéressée aux événements se déroulant dans les MDSC après un traitement par 5-FU ou Gem, conduisant à l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans ces cellules mais également aux conséquences de cette activation sur le système immunitaire.

L'objectif du second projet est la détermination du rôle de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Après avoir observé l'expression de NLRP3 dans des lymphocytes en différenciation, je me suis demandé quelle utilité NLRP3 pouvait avoir dans les lymphocytes T CD4 sachant que celui-ci est essentiellement connu pour son action dans l'inflammasome. De plus, les lymphocytes Th2 ne possédant pas NLRP3 produisent moins d'IL-4. La définition du rôle de NLRP3 dans la différenciation Th2 m'a alors semblé être une question essentielle. J'ai donc étudié les facteurs de transcription et les protéines impliquées dans la polarisation Th2.

# Résultats

## A. Article 1

« Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. »

Nature Medicine, Janvier 2013

Les réponses immunitaires sont un des éléments clés déterminant l'évolution des tumeurs. Leur rôle dans le contrôle de la croissance tumorale a été démontré dans de nombreux modèles murins mais également chez l'Homme. De façon étonnante, les effets des chimiothérapies sur ces réponses immunitaires anti-tumorales sont très peu étudiés et restent largement méconnus. De plus, les traitements par chimiothérapies sont depuis longtemps suspectés d'induire l'immunosuppression. Cependant, des études récentes ont montré que certaines chimiothérapies pouvaient augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale grâce à leur élimination de cellules immunosuppressives ou en provoquant une mort immunogène des cellules tumorales, dont les débris pourront être captés par les CPA qui seront alors capables de déclencher une réponse immunitaire spécifique contre les cellules tumorales. Deux chimiothérapies, le 5-Fluorouracile (5FU) et la Gemcitabine (Gem) ont été montrées comme capables d'éliminer de façon spécifique les MDSC, population de cellules myéloïdes immatures qui supprime l'activation des lymphocytes T chez l'Homme et la souris. L'élimination de cette population par le 5-FU ou la Gem permet de restaurer l'immunité, observable grâce à l'augmentation d'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes T CD8, et d'augmenter la survie des souris. Cependant, ces traitements ne sont pas suffisants pour empêcher le retour de la croissance tumorale, mettant en avant le besoin d'identifier les mécanismes mis en place après le traitement par chimiothérapie et menant à la persistance et à l'évolution de la tumeur.

Une étude précédemment effectuée par notre équipe a montré que le 5-FU et la gemcitabine sont capables d'éliminer de façon spécifique les MDSC sans affecter les autres cellules du système immunitaire (annexe 1). Cependant, les suivis de croissance tumorale montrent que l'effet bénéfique de cette diminution de l'immunosuppression n'est que temporaire, c'est pourquoi j'ai cherché à comprendre les événements se déroulant après un traitement par 5-FU ou par Gem dans la souris et plus particulièrement dans les MDSC.

Dans cette étude, en complément des expériences réalisées sur les souris, j'ai utilisé une lignée de MDSC établie par Vincenzo Bronté et appelée MSC-2. Ces cellules m'ont été d'une grande utilité puisqu'elles m'ont permis d'établir la cascade d'évènements intracellulaires se déroulant après un traitement par 5-FU ou par Gem avant de les vérifier *ex vivo* sur des MDSC (Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) provenant de souris porteuses de tumeur.

J'ai pu montrer que le 5-FU et la Gem, en plus de leur capacité à éliminer les MDSC, activaient l'inflammasome NLRP3 dans ces mêmes cellules et provoquaient la production d'IL-1 $\beta$ . Si cette IL-1 $\beta$  n'a pas d'effet direct sur les cellules tumorales, elle est responsable du développement du potentiel immunosuppresseur d'une autre population de cellules, les TH17. L'IL-1 $\beta$  augmente en effet la capacité des Th17 à produire de l'IL-17, qui limite l'efficacité anti-tumorale de la chimiothérapie via ses effets pro-angiogéniques. Ces résultats démontrent l'ambivalence d'un traitement par 5-FU ou par Gem sur le système immunitaire.

Les données supplémentaires relatives à cet article constituent l'annexe 2

# Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth

Mélanie Bruchard<sup>1,2,8</sup>, Grégoire Mignot<sup>1,2,8</sup>, Valentin Derangère<sup>1,2</sup>, Fanny Chalmin<sup>1,2</sup>, Angélique Chevriaux<sup>1-3</sup>, Frédérique Végran<sup>1,2</sup>, Wilfrid Boireau<sup>4</sup>, Benoit Simon<sup>4</sup>, Bernhard Ryffel<sup>5</sup>, Jean Louis Connat<sup>6</sup>, Jean Kanellopoulos<sup>7</sup>, François Martin<sup>1,2</sup>, Cédric Rébé<sup>1-3</sup>, Lionel Apetoh<sup>1-3,8</sup> & François Ghiringhelli<sup>1-3,8</sup>

Chemotherapeutic agents are widely used for cancer treatment. In addition to their direct cytotoxic effects, these agents harness the host's immune system, which contributes to their antitumor activity. Here we show that two clinically used chemotherapeutic agents, gemcitabine (Gem) and 5-fluorouracil (5FU), activate the NOD-like receptor family, pyrin domain containing-3 protein (Nlrp3)-dependent caspase-1 activation complex (termed the inflammasome) in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), leading to production of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), which curtails anticancer immunity. Chemotherapy-triggered IL-1 $\beta$  secretion relied on lysosomal permeabilization and the release of cathepsin B, which bound to Nlrp3 and drove caspase-1 activation. MDSC-derived IL-1 $\beta$  induced secretion of IL-17 by CD4<sup>+</sup> T cells, which blunted the anticancer efficacy of the chemotherapy. Accordingly, Gem and 5FU exerted higher antitumor effects when tumors were established in *Nlrp3*<sup>-/-</sup> or *Casp1*<sup>-/-</sup> mice or wild-type mice treated with interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra). Altogether, these results identify how activation of the Nlrp3 inflammasome in MDSCs by 5FU and Gem limits the antitumor efficacy of these chemotherapeutic agents.

Immune responses against cancer are an important factor determining tumor evolution<sup>1,2</sup>. In many experimental and human cancers, T cell immune responses are involved in tumor-growth control and restrain tumor progression. By contrast, the role of cytotoxic agents on immune responses remains largely unresolved. Chemotherapy treatment in cancer has long been suspected to induce systemic immunosuppression<sup>3</sup>. However, recent studies report that some chemotherapeutic agents instead enhance antitumor immune responses through their capacity to eliminate immunosuppressive cells or trigger 'immunogenic cell death' of tumor cells<sup>4,5</sup>. Two drugs, Gem<sup>6-8</sup> and 5FU<sup>9</sup>, selectively deplete MDSCs<sup>9-11</sup>, a population of immature myeloid cells that suppresses T cell activation in humans and mice<sup>12-14</sup>. 5FU-mediated MDSC depletion increased interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production by tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells and the survival of tumor-bearing mice but was insufficient to avoid tumor relapse, underscoring the need to identify additional molecular pathways that favor cancer-cell resistance to chemotherapy<sup>9</sup>.

Here we show that Gem and 5FU, in addition to their capacity to selectively kill MDSCs, activate the NLRP3 inflammasome in these cells, leading to IL-1 $\beta$  release, which restrains their antitumor efficacy. Although IL-1 $\beta$  did not affect the sensitivity of tumor cells to 5FU,

it enhanced the capacity of CD4<sup>+</sup> T cells to produce IL-17, which limited the antitumor effect of 5FU through an IL-17-dependent proangiogenic effect. These results unravel the ambivalent effect of 5FU and Gem in the antitumor immune response.

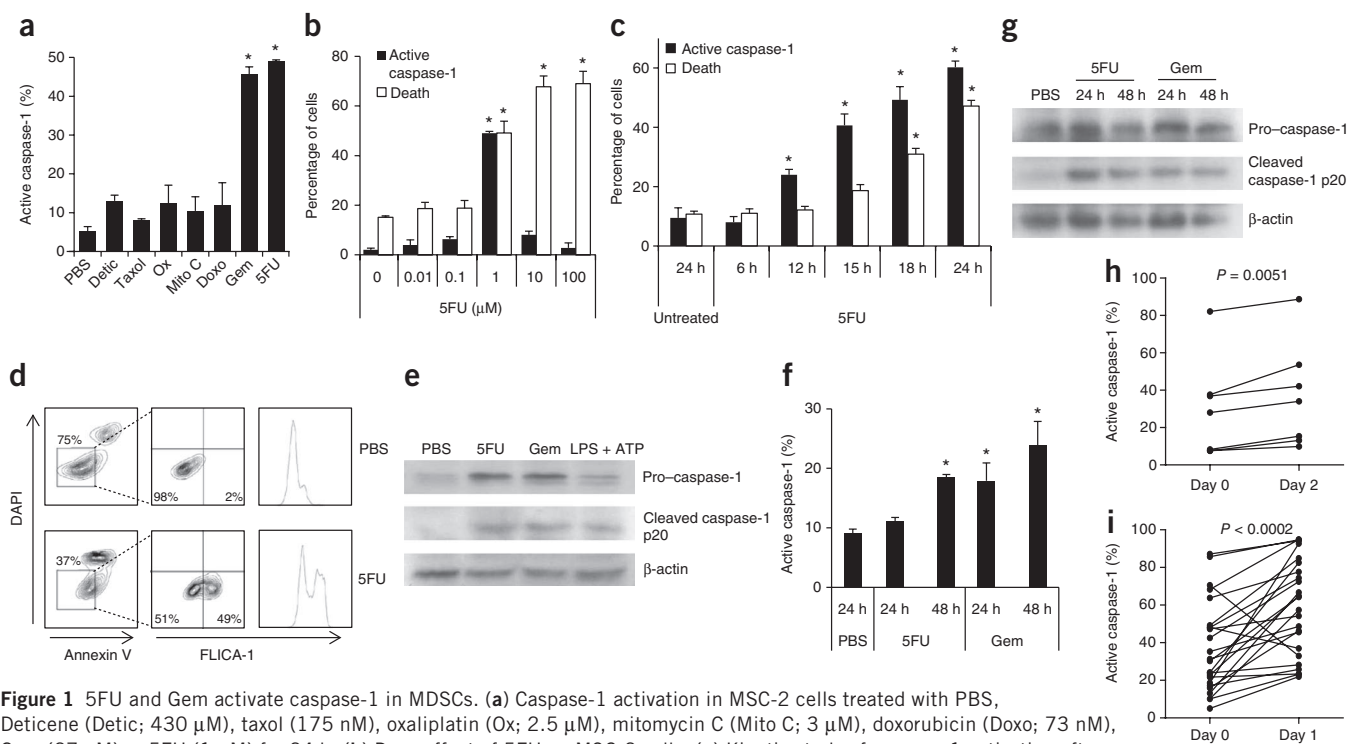
## RESULTS

### 5FU and Gem induce caspase-1 activation in MDSCs

We previously demonstrated that 5FU and Gem can induce cell death of MDSCs. Using MSC-2 cells, an established MDSC cell line<sup>9</sup>, we focused on the capacity of various chemotherapeutic agents to induce caspase-1 activation in MDSCs. We determined the drug concentrations that induced 50% MSC-2 cell death (Supplementary Fig. 1). Only Gem and 5FU activated caspase-1 in MDSCs (Fig. 1a). The dose effects of 5FU and Gem demonstrated that caspase-1 activation did not correlate with the amount of dead cells (Fig. 1b and Supplementary Fig. 2). We determined the kinetic activation of caspase-1 after 5FU treatment and showed that caspase-1 activation was detectable at around 12 h after 5FU treatment, meaning before evidence of cell death, which appears after 18 h (Fig. 1c). We found similar results using Gem (Supplementary Fig. 3). The delay in caspase-1 activation was expected, as both drugs require conversion

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U866, Dijon, France. <sup>2</sup>Faculté de Médecine et pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon, France. <sup>3</sup>Centre Georges François Leclerc, Dijon, France. <sup>4</sup>Franche-Comté Electronique, Mécanique, Thermique et Optique-Sciences et Technologies (FEMTO-ST) Institute, Université de Franche Comté, Besançon, France. <sup>5</sup>Laboratory of Molecular Immunology and Embryology, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unités Mixtes de Recherche (UMR) 6218, Orléans, France. <sup>6</sup>INSERM U866, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, Institut Fédérative de Recherche (IFR) Santé-Sciences et Techniques de l'Information et de la Communication (STIC), Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, Dijon, France. <sup>7</sup>UMR 8619, Université Paris Sud-Paris 11, Orsay Cedex, France. <sup>8</sup>These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to F.G. (fghiringhelli@cgl.fr).

Received 20 July; accepted 17 October; published online 2 December 2012; doi:10.1038/nm.2999



**Figure 1** 5FU and Gem activate caspase-1 in MDSCs. **(a)** Caspase-1 activation in MSC-2 cells treated with PBS, Deticene (Detic; 430  $\mu\text{M}$ ), taxol (175 nM), oxaliplatin (Ox; 2.5  $\mu\text{M}$ ), mitomycin C (Mito C; 3  $\mu\text{M}$ ), doxorubicin (Doxo; 73 nM), Gem (27 nM) or 5FU (1  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. **(b)** Dose effect of 5FU on MSC-2 cells. **(c)** Kinetic study of caspase-1 activation after 5FU treatment (1  $\mu\text{M}$ ). In **a–c**, caspase-1 activation and cell death were measured using fluorescent probes and annexin V and DAPI staining, respectively. **(d)** DAPI and FLICA-1 fluorescence tested in MSC-2 cells treated with PBS or 5FU (1  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. The percentages shown represent the frequency of positive cells. **(e)** Western blot detecting caspase-1 activation in MSC-2 cells treated with 5FU (1  $\mu\text{M}$ ), Gem (27 nM) or lipopolysaccharide (LPS) (100 ng  $\text{ml}^{-1}$ ) and ATP (5 mM) as a positive control for 24 h.  $\beta$ -actin was used as a loading control. **(f,g)** Caspase-1 activation and cleaved caspase-1 in EL4 tumor-bearing mice treated with PBS, 5FU (50 mg per kg body weight) or Gem (120 mg per kg body weight). Caspase-1 activity after 24 h and 48 h in labeled splenic CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs **(f)**. Western blot detecting cleaved caspase-1 in sorted CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs **(g)**. **(h)** Caspase-1 activation, assessed by flow cytometry, in HLA DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> MDSCs derived from PBMCs of patients with cancer that had been cultured with PBS or 5FU (1  $\mu\text{M}$ ) for 2 d.  $n = 8$  patients. **(i)** Caspase-1 activation, assessed by fluorescent probe, in HLA DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> MDSCs derived from PBMCs of patients with cancer obtained before and 1 d after *in vivo* 5FU treatment.  $n = 24$  patients. Data are representative of one out of three experiments and are the mean  $\pm$  s.e.m. **(a–g)**. \* $P < 0.05$  by Wilcoxon rank-sum test.

into an active metabolite<sup>15,16</sup>. Notably, we found caspase-1 activation in live cells negative for both annexin V and DAPI (**Fig. 1d**). These data suggest that 5FU- and Gem-induced caspase-1 activation is dissociated from cell death. We confirmed these results using western blot (**Fig. 1e**). *In vitro*, 5FU induced caspase-1 activation in other myeloid subsets only at high doses that were not clinically relevant (100  $\mu\text{M}$ ) (**Supplementary Fig. 4**). *In vivo*, systemic treatment of tumor-bearing mice with Gem or 5FU induced activation of caspase-1 at 24 h or 48 h, respectively, in MDSCs (**Fig. 1f**), and the amount of caspase-1 activation was similar in monocytic and granulocytic MDSC subsets (**Supplementary Fig. 5**). Western blot analysis of cell-sorted splenic MDSCs confirmed this result (**Fig. 1g**). Kinetic analysis of splenic MDSC number and MDSC caspase-1 activation showed that caspase-1 activation occurred before the nadir of MDSC elimination (**Supplementary Fig. 6**).

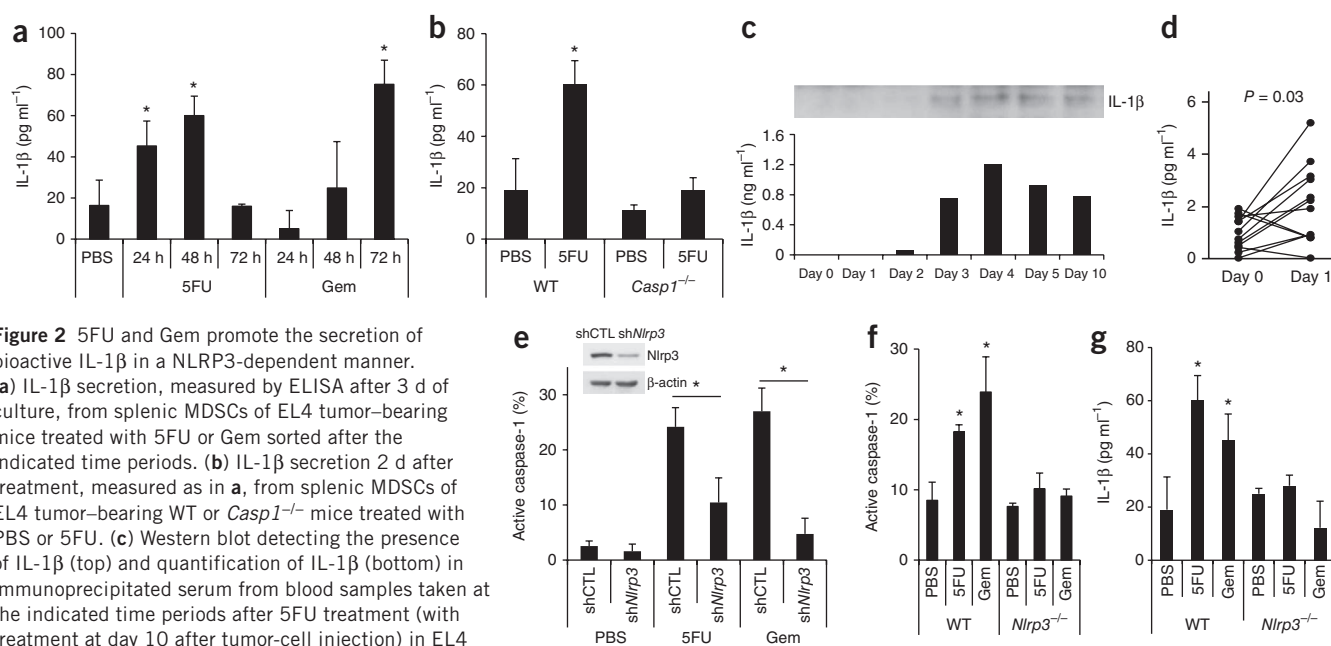
In human MDSCs, we noted that 5FU activated caspase-1 in MDSCs from patients with metastatic colorectal cancer 48 h after *in vitro* administration (**Fig. 1h**). In addition, we also found caspase-1 activation in circulating MDSCs from 22 out of 24 patients with metastatic colorectal cancer who received chemotherapy containing 5FU ( $P < 0.0002$ ) (**Fig. 1i**). We found similar caspase-1 activation in patients treated with 5FU plus oxaliplatin or irinotecan but not in patients treated without 5FU (data not shown). Double labeling using DAPI and caspase-1 fluorochrome inhibitor of caspase (FLICA) showed that 1 d after 5FU treatment the proportion of dying DAPI-positive cells

was unchanged and only the ratio of caspase-1-positive cells to living DAPI-negative cells increased, suggesting that 5FU induced caspase-1 activation in live cells rather than the death of caspase-1-negative MDSCs (**Supplementary Fig. 7**). Together these results demonstrate that 5FU and Gem activate caspase-1 in MDSCs *in vitro* and *in vivo*.

### NLRP3-dependent induction of IL-1 $\beta$ by 5FU and Gem

Caspase-1 activation is required for the secretion of bioactive IL-1 $\beta$ <sup>17</sup>. Accordingly, MDSCs from wild-type tumor-bearing mice treated with Gem or 5FU secreted IL-1 $\beta$  (**Fig. 2a**). This IL-1 $\beta$  secretion was comparable in both monocytic and granulocytic subsets (data not shown). MDSCs from tumor-bearing caspase-1-deficient (*Casp1*<sup>-/-</sup>) mice treated with 5FU were unable to produce IL-1 $\beta$  (**Fig. 2b**). These data suggest that 5FU and Gem activate caspase-1 in MDSCs, leading to IL-1 $\beta$  secretion. *In vivo*, we found IL-1 $\beta$  in the serum of tumor-bearing wild-type mice from day 2–10 after 5FU administration (**Fig. 2c**). Notably, MDSC depletion before 5FU treatment aborted IL-1 $\beta$  production, suggesting that MDSCs are the primary producers of IL-1 $\beta$  (**Supplementary Fig. 8**). In the cohort of patients with metastatic colorectal cancer who were treated with 5FU-based chemotherapy, IL-1 $\beta$  serum concentrations were increased in 9 out of 12 patients 24 h after 5FU administration ( $P = 0.03$ ) (**Fig. 2d**).

The NLRP3 inflammasome is frequently involved in caspase-1 activation induced by endogenous signals<sup>17</sup>. We found that *in vitro*



**Figure 2** 5FU and Gem promote the secretion of bioactive IL-1 $\beta$  in a NLRP3-dependent manner. **(a)** IL-1 $\beta$  secretion, measured by ELISA after 3 d of culture, from splenic MDSCs of EL4 tumor-bearing mice treated with 5FU or Gem sorted after the indicated time periods. **(b)** IL-1 $\beta$  secretion 2 d after treatment, measured as in **a**, from splenic MDSCs of EL4 tumor-bearing WT or *Casp1*<sup>-/-</sup> mice treated with PBS or 5FU. **(c)** Western blot detecting the presence of IL-1 $\beta$  (top) and quantification of IL-1 $\beta$  (bottom) in immunoprecipitated serum from blood samples taken at the indicated time periods after 5FU treatment (with treatment at day 10 after tumor-cell injection) in EL4 tumor-bearing mice. The serum was immunoprecipitated using IL-1 $\beta$ -specific antibody. **(d)** IL-1 $\beta$  concentration in the sera of patients with colon cancer obtained before and 1 d after *in vivo* 5FU treatment. *n* = 12 patients. **(e)** MSC-2 cells transduced with control shRNA (shCTL) or *Nlrp3* shRNA (sh*Nlrp3*) and treated with PBS, 5FU (1  $\mu$ M) or Gem (27 nM) for 24 h. Caspase-1 activation was measured by flow cytometry. Inset, NLRP3 expression in shCTL or sh*Nlrp3* using western blot. EL4 tumor-bearing WT or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice were treated with PBS, 5FU (50 mg per kg body weight) or Gem (120 mg per kg body weight). After 48 h, splenic CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> cells were labeled. **(f,g)** Caspase-1 activation determined by flow cytometry **(f)** and IL-1 $\beta$  secretion from sorted splenic MDSCs cultured for 3 days measured by ELISA **(g)**. Data are representative of one out of five **(a,e)** or three **(b,c,f,g)** experiments and are the mean  $\pm$  s.e.m. \**P* < 0.05 by Wilcoxon rank-sum test.

treatment of MDSCs with Gem or 5FU activated caspase-1 in MDSCs transduced with control shRNA but not in those transduced with shRNA specific for *Nlrp3*, (**Fig. 2e**). In addition, 5FU and Gem activated caspase-1 in MDSCs from wild-type but not *Nlrp3*-deficient (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) mice *in vivo* (**Fig. 2f**). MDSCs from tumor-bearing *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice were also unable to produce IL-1 $\beta$  after 5FU or Gem treatment, in contrast to wild-type mice (**Fig. 2g**). These data demonstrate that 5FU and Gem induce activation of the NLRP3 inflammasome in MDSCs, which triggers secretion of bioactive IL-1 $\beta$ .

### Cathepsin B mediates inflammasome activation

NLRP3 activation may occur through crystal phagocytosis, induction of radical oxygen species (ROS), altered calcium or potassium ionic movements, high concentrations of extracellular ATP or lysosome disruption and cathepsin B release<sup>18</sup>. To identify the NLRP3 activator in 5FU- and Gem-induced inflammasome activation, we tested the effect of selective inhibitors on caspase-1 activation in 5FU-treated MDSCs. 5FU-induced caspase-1 activation was not prevented by inhibition of phagocytosis, ROS synthesis or the P2X purinoceptor 7 (P2rx7) channel (**Fig. 3a**). Inhibition of lysosomal acidification using bafilomycin A blunted the caspase-1 activation induced by 5FU or Gem (**Fig. 3a** and data not shown). 5FU and Gem induced permeabilization of lysosomes (**Fig. 3b**). We detected mature cathepsin B in MDSCs treated with 5FU or Gem (**Fig. 3c** and **Supplementary Fig. 9**).

Moreover, we found reduced caspase-1 activation in MDSCs after 5FU or Gem treatment in the presence of a cathepsin B inhibitor<sup>19</sup> or in MDSCs transfected with cathepsin B shRNA (**Fig. 3d**). Confocal microscopy confirmed that 5FU and Gem induced cathepsin B cytosolic release (**Fig. 3e**). In human MDSCs, caspase-1

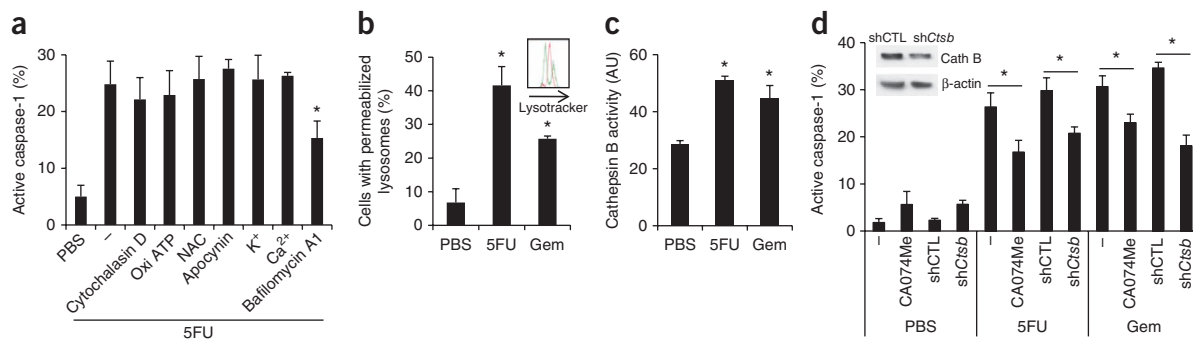
activation induced by 5FU was blunted by the cathepsin B inhibitor (**Fig. 3f**). In a cohort of patients with metastatic colorectal cancer, we also observed that infusion of 5FU induced cathepsin B activity in circulating MDSCs in 16 of 21 patients (*P* = 0.01) (**Fig. 3g**). Together these data demonstrate that 5FU and Gem trigger NLRP3 inflammasome activation mainly through the release of cathepsin B in the cytosol as a result of chemotherapy-dependent lysosome permeabilization.

### Cathepsin B directly interacts with Nlrp3

We found that mouse recombinant Nlrp3 and cathepsin B proteins co-precipitated *in vitro* (**Fig. 4a**). We confirmed the specificity of this interaction using human NLRP3 and cathepsin B recombinant proteins in a surface plasmon resonance assay (**Fig. 4b**).

In a cellular system, we also found a specific interaction between endogenous Nlrp3 and cathepsin B in mouse MSC-2 cells treated with 5FU (**Fig. 4c**). We obtained the same results with cell-sorted MDSCs from tumor-bearing mice, demonstrating that 5FU triggered this interaction in MDSCs (**Fig. 4d**). Nlrp3 contains three protein domains<sup>20</sup>. We generated recombinant vesicular stomatitis virus (VSV)-tagged Nlrp3 protein deleted in the pyrin domain (PYD), the NACHT domain or the leucine-rich repeat (LRR) domain (**Fig. 4e**) and found that cathepsin B interacted with Nlrp3 deleted in the PYD or NACHT fragment but not with Nlrp3 deleted in the LRR fragment (**Fig. 4f**).

Cathepsin B was readily able to cleave the control protein nucleophosmin but not Nlrp3, suggesting that activation of Nlrp3 by cathepsin B is not caused by direct cleavage (**Supplementary Fig. 10**). Together, these data demonstrate that 5FU allows a direct interaction between cathepsin B and the LRR domain of Nlrp3 through release of cathepsin B from the lysosome.



**Figure 3** 5FU- and Gem-induced NLRP3 inflammasome activation results from cathepsin B release from lysosomes.

(a) Caspase-1 activation, determined by flow cytometry, in MSC-2 cells treated with PBS or 5FU (1  $\mu$ M) in the absence or presence of cytochalasin D (200 nM), oxi ATP (150  $\mu$ M), *N*-acetylcysteine (NAC; 10 mM), apocynin (20  $\mu$ M) or bafilomycin A1 (10 nM) for 24 h or  $K^+$  (140 mM) or  $Ca^{2+}$  (1.2 mM) for 1 h. (b) Lysosomal integrity, measured using LysoTracker, of MSC-2 cells treated with PBS, 5FU (1  $\mu$ M) or Gem (27 nM). The inset shows a representative LysoTracker signal (PBS-treated cells, red; 5FU-treated cells, green). (c) Cathepsin B activity, assessed by fluorometry, of the cells described in b. AU, arbitrary units. (d) Caspase-1 activation, determined as in a, in MSC-2 cells incubated in the absence or presence of the cathepsin B (Cath B) inhibitor CA074Me (33  $\mu$ M) or transduced with control shRNA (shCTL) or cathepsin B shRNA (shCtsb) and treated as in b. (e) Colocalization of cathepsin B and CD107a, assessed by confocal microscopy, in MSC-2 cells cultured on glass, treated for 24 h as in **Figure 2b** and fixed and stained for cathepsin B and CD107a. Scale bar, 10  $\mu$ m. (f) Caspase-1 activation, assessed by flow cytometry, in HLA DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> MDSCs derived from PBMCs of patients with cancer that were cultured with PBS or 5FU (40  $\mu$ M) in the presence or absence of CA074Me for 2 d. (g) Cathepsin B activity, assessed by fluorometry, in PBMCs from patients with colon cancer obtained before and 1 d after *in vivo* 5FU treatment. Data are representative of one out of four experiments and are the mean  $\pm$  s.e.m. (a–e). \* $P$  < 0.05 by Wilcoxon rank-sum test.

### IL-1 $\beta$ production restrains 5FU antitumor effect

Genetic inactivation of *Nlrp3* or *Casp1* enhanced the antitumor efficacy of 5FU against EL4 thymoma growing *in vivo* (**Fig. 5a**). Whereas all wild-type mice died within 30 d, 42% and 30% of *Casp1*<sup>-/-</sup> and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice, respectively, remained tumor free 60 d after 5FU treatment (**Supplementary Table 1**). Anakinra is a recombinant soluble IL-1Ra. Administration of anakinra enhanced the antitumor efficacy of 5FU in the EL4 tumor model and the combination induced cure in 45% of the mice (**Fig. 5b**). Notably, MDSC depletion before 5FU treatment aborted the antitumor effect of the IL-1Ra. Similarly, the enhanced efficacy of 5FU treatment in *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and *Casp1*<sup>-/-</sup> mice was abrogated by MDSC depletion (**Supplementary Table 1**). We extended this observation to three other experimental tumor models: 4T1 mammary carcinoma, B16F10 melanoma and Lewis lung carcinoma (LLC) (**Fig. 5c**).

We noted that neither IL-1 $\beta$  nor IL-1Ra had an impact on the direct cytotoxic effect of 5FU in the EL4, B16, LLC or 4T1 tumor cell models (**Fig. 5d** and **Supplementary Fig. 11**). In addition, genetic inactivation of IL-1R markedly enhanced the antitumor efficacy of 5FU against EL4 thymomas *in vivo*, thus demonstrating that IL-1 $\beta$  does not exert its effect on tumor cells but rather on host cells (**Fig. 5e**).

### IL-1 $\beta$ production enhances IL-17 production by CD4<sup>+</sup> T cells

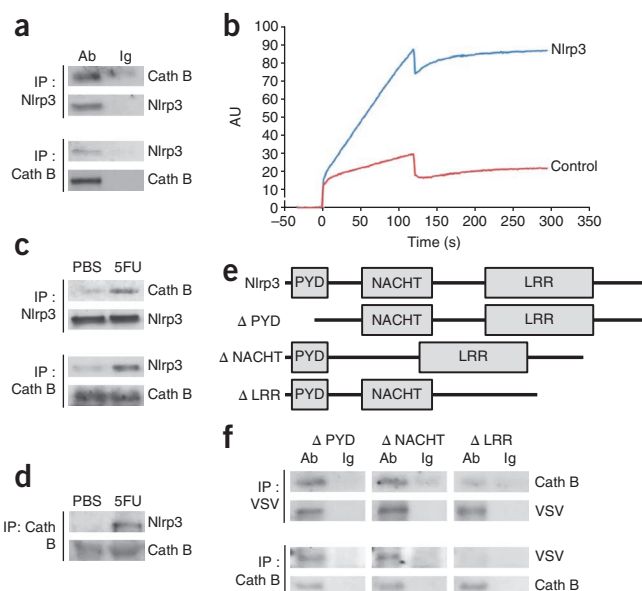
IL-1 $\beta$  has a crucial role in inflammation<sup>21</sup>, as illustrated by its ability to induce IL-17 secretion from proinflammatory CD4<sup>+</sup> T cells<sup>22,23</sup>. IL-1 $\beta$  has also been implicated in CD8<sup>+</sup> T cell activation<sup>5</sup>. We found that although high concentrations of IL-1 $\beta$  were required for activating

CD8<sup>+</sup> T cells (**Supplementary Fig. 12**), low concentrations of IL-1 $\beta$ , similar to those released by MDSCs as a result of 5FU treatment, were sufficient to trigger IL-17 production by CD4<sup>+</sup> cells (**Fig. 6a**) but did not induce production of IFN- $\gamma$  or IL-4, expression of forkhead box P3 (Foxp3) or activation of CD8<sup>+</sup> T cells (data not shown). Notably, CD4 depletion enhanced the antitumor effect of 5FU but did not improve the effect of the combination of 5FU plus IL-1Ra, suggesting that CD4<sup>+</sup> T cells limit 5FU efficacy in an IL-1-dependent manner (**Fig. 6b**). In contrast, CD8<sup>+</sup> T cell depletion had no impact on the antitumor efficacy of 5FU or 5FU plus IL-1Ra (**Supplementary Fig. 13**).

We found that naive T cells cultured with MDSCs isolated from tumor-bearing mice treated with Gem or 5FU differentiated into IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells in an IL-1-dependent manner (**Fig. 6c**). To validate the involvement of the NLRP3 inflammasome in IL-17 secretion from CD4<sup>+</sup> T cells, we cultured naive T cells with MDSCs from tumor-bearing wild-type, *Casp1*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, cathepsin B-deficient (*Ctsb*<sup>-/-</sup>) or *P2rx7*<sup>-/-</sup> (control) mice treated with or without 5FU. We found that only wild-type or control *P2rx7*<sup>-/-</sup> MDSCs from tumor-bearing mice treated with 5FU were able to enhance IL-17 production by CD4<sup>+</sup> T cells in an IL-1-dependent manner, whereas *Casp1*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and *Ctsb*<sup>-/-</sup> MDSCs were unable to do so (**Fig. 6c**). We confirmed these results using ROR- $\gamma$ t-GFP mice (**Supplementary Fig. 14**). *In vivo*, 5FU and Gem enhanced the capacity of CD4<sup>+</sup> cells in tumor-draining lymph nodes to produce IL-17 in a caspase-1-dependent manner; however, caspase-1 deficiency did not affect IL-4 or IFN- $\gamma$  secretion by these cells (**Fig. 6d** and data not shown).



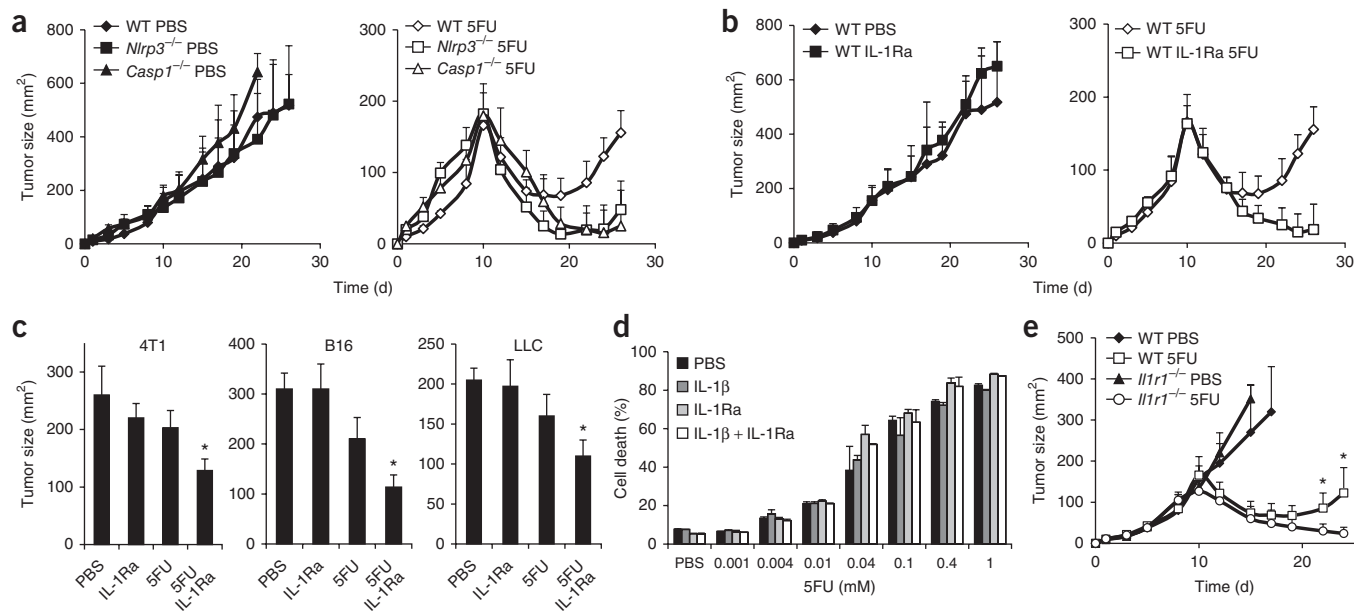
**Figure 4** Nlrp3 binds to cathepsin B. **(a)** Immunoprecipitation (IP) and western blot performed using antibodies to Nlrp3 or cathepsin B (Ab) or isotype control antibodies (Ig). Recombinant mouse Nlrp3 protein synthesized *in vitro* using a cell-free system and incubated with recombinant mouse cathepsin B (Cath B) for 1 h before immunoprecipitation. **(b)** Surface plasmon resonance studying the binding of Nlrp3 (10 nM) to a cathepsin B protein chip and a rat albumin serum (RSA) control chip. **(c)** Immunoprecipitation and western blots performed as in **a** of MSC-2 cells treated with PBS or 5FU (1  $\mu$ M) for 24 h. **(d)** Immunoprecipitation performed with antibody to cathepsin B followed by western blot performed with antibody to Nlrp3 of cell-sorted splenic MDSCs from EL4 tumor-bearing mice 24 h after treatment with PBS or 5FU (50 mg per kg body weight). **(e)** The design of VSV-tagged recombinant mouse Nlrp3 deleted ( $\Delta$ ) in the PYD or the NACHT or LRR domain. **(f)** Immunoprecipitation and western blot performed as in **a** on the truncated Nlrp3 proteins described in **e** and incubated with recombinant mouse cathepsin B. Data are representative of one out of three experiments (**a**–**f**).



We also found an increased frequency of CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells in the tumor-draining lymph nodes of ROR- $\gamma$ T-GFP mice after treatment with Gem or 5FU. This increase was abrogated by IL-1Ra injection (**Supplementary Fig. 15**). In humans, we found enhanced production of IL-17 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) 14 d after 5FU treatment (**Fig. 6e**).

IL-17 has been reported to promote angiogenesis<sup>24–26</sup>, resulting in tumor progression. In mice, we found that *in vivo* 5FU drove the expression of T helper type 17 (T<sub>H</sub>17) cell-related genes (*Il17a* and *Rorc*) in the tumor bed, as well as the expression of angiogenesis-related genes (*Eng* and *Pecam1*), whereas we did not observe increased expression of these genes when we used 5FU plus IL-1Ra (**Fig. 6f**).

As MDSC-derived IL-1 $\beta$  enhanced IL-17 secretion from CD4<sup>+</sup> T cells, we tested whether the enhanced antitumor effect between 5FU and the inhibition of IL-1 $\beta$  relied on downregulation of IL-17. 5FU showed a better antitumor efficacy in *Il17a*<sup>-/-</sup> mice compared to its effect in wild-type mice (**Fig. 6g**), and IL-1Ra did not enhance the efficacy of 5FU in *Il17a*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 6g**). Together these data demonstrate that 5FU drives IL-1-dependent CD4<sup>+</sup> T cell polarization into IL-17-producing cells and IL-17 limits the therapeutic effect of 5FU.

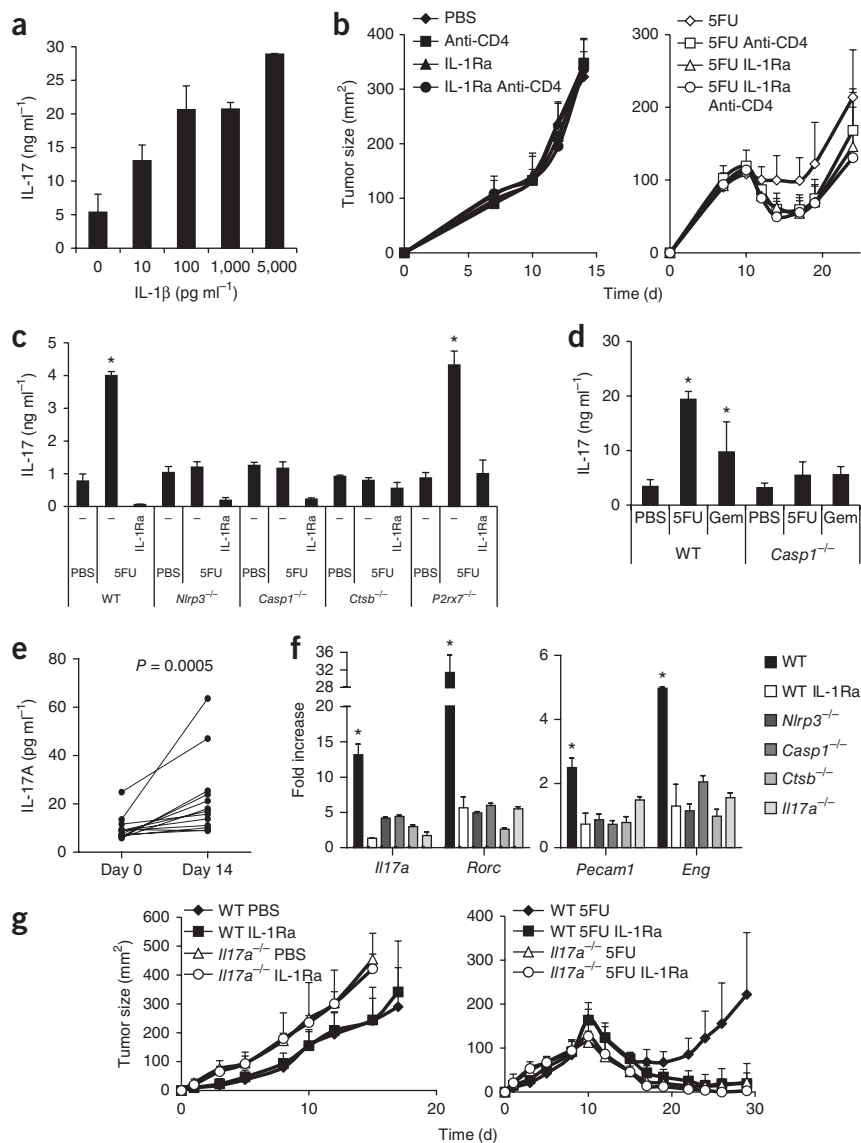


**Figure 5** NLRP3-dependent IL-1 $\beta$  production restrains the antitumor effect of 5FU. **(a)** Tumor growth, monitored three times a week, in EL4 tumor-bearing WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and *Casp1*<sup>-/-</sup> mice that received PBS (left) or 5FU (50 mg per kg body weight; right) 10 d after tumor-cell injection. **(b)** Tumor growth, monitored as in **a**, in EL4 tumor-bearing WT mice treated with PBS or IL-1Ra (1.5 mg per kg body weight) three times a week that also received PBS (left) or 5FU (50 mg per kg body weight; right) 10 d after tumor-cell injection. **(c)** Tumor growth, monitored as in **a**, in WT mice with 4T1, B16 or LLC tumors treated with PBS or IL-1Ra (1.5 mg per kg body weight) three times a week that also received PBS or 5FU (50 mg per kg body weight) at days 5 and 7 (4T1 and LLC) or days 5, 7 and 9 (B16). Tumor sizes at days 20 (4T1), 18 (B16) and 30 (LLC) are shown. **(d)** Viability of EL4 cells treated with increasing doses of 5FU alone or with IL-1 $\beta$  (200 pg ml<sup>-1</sup>), IL-1Ra (10 nM) or both assessed after 2 d by flow cytometry. **(e)** As described in **a** but using *Il1r1*<sup>-/-</sup> and WT mice. Data are representative of one out of three experiments and are the mean  $\pm$  s.e.m. (**a**–**e**).

\**P* < 0.05 by Wilcoxon rank-sum test.

**Figure 6** NLRP3-dependent IL-1 $\beta$  production enhances IL-17 production by CD4 $^{+}$  T cells that restrain the antitumor effect of 5FU.

(a) IL-17 concentrations, assessed by ELISA, in IL-17-secreting T cells generated from purified naive CD4 $^{+}$ CD62L $^{+}$  T cells that were stimulated with antibodies to CD3 and CD28 along with TGF- $\beta$ , IL-6 and increasing doses of IL-1 $\beta$  for 72 h. (b) Tumor growth in EL4 tumor-bearing WT mice depleted of CD4 $^{+}$  T cells and treated as in **Figure 5b**. (c) IL-17 secretion, measured after 3 d by ELISA, in splenic MDSCs from EL4 tumor-bearing WT, *Nlrp3* $^{-/-}$ , *Casp1* $^{-/-}$ , *Ctsb* $^{-/-}$  or *P2rx7* $^{-/-}$  mice treated with PBS or 5FU (50 mg per kg body weight) that were cultured after 48 h with naive CD4 $^{+}$ CD62L $^{+}$  T cells and activated in the presence of antibodies to CD3 (5  $\mu$ g ml $^{-1}$ ) and CD28 (5  $\mu$ g ml $^{-1}$ ) in the absence or presence of IL-1Ra (10 nM). (d) IL-17 secretion, measured after 3 d by ELISA, in draining lymph node cells harvested after 5 d from EL4 tumor-bearing WT or *Casp1* $^{-/-}$  mice treated with PBS, 5FU (50 mg per kg body weight) or Gem (120 mg per kg body weight) and activated in the presence of antibodies to CD3 (5  $\mu$ g ml $^{-1}$ ) and CD28 (5  $\mu$ g ml $^{-1}$ ). (e) IL-17A production, measured by ELISA after stimulation with monoclonal antibodies to CD3 and CD28, in PBMCs from 13 patients with colon cancer obtained before and 14 d after *in vivo* 5FU treatment. (f) Quantitative real-time PCR after 48 h measuring the expression of *Il17a* and *Rorc* (relative to the expression of *Cd3e* mRNA) or *Pecam1* and *Eng* (relative to the expression of *Actb* mRNA) in tumors from EL4 tumor-bearing WT, *Nlrp3* $^{-/-}$ , *Casp1* $^{-/-}$ , *Ctsb* $^{-/-}$  or *Il17a $^{-/-}$  mice treated with PBS or 5FU (50 mg per kg body weight). (g) As described in **Figure 5b** but using *Il17a $^{-/-}$  mice treated or not with 5FU, IL-1Ra or both. Data are representative of one out of three (a,c) or one out of two (b,d,f,g) experiments and are the mean  $\pm$  s.e.m. \* $P$  < 0.05 by Wilcoxon rank-sum test.**



## DISCUSSION

Here we show that 5FU and Gem induce direct activation of the NLRP3 inflammasome through the release of cathepsin B from lysosomes, leading to secretion of IL-1 $\beta$ , production of IL-17 and tumor growth. Although we previously reported a positive antitumor immune effect of 5FU caused by its capacity to deplete MDSCs<sup>9</sup>, 5FU also induces IL-1 $\beta$  release by MDSCs. IL-1 $\beta$  production could thereby restrain the beneficial effect of MDSC depletion. The *in vivo* relevance of these events may be explained by their temporal dissociation. However, we were unable to induce MDSC depletion without caspase-1 activation by modulating 5FU dose, suggesting the rationale of combining IL-1 inhibition with 5FU treatment.

In this report we demonstrate that 5FU and Gem do not induce ROS activation or potassium efflux in MDSCs, two classical activators of the inflammasome, but they do trigger NLRP3 activation through lysosome permeabilization and cathepsin B release. In addition, we show that cathepsin B induces a direct activation of Nlrp3 by binding to its LRR fragment without inducing cleavage.

Our observation underscores an atypical mode of caspase-1 activation that occurred 12 h after the stimulus induced by 5FU or Gem.

This delay is very different from those usually observed with other ligands. This result may be expected because of the requirement of 5FU to metabolize and integrate into DNA to exert its effects. In our observations, 5FU induced caspase-1 activation through lysosome destabilization. These data are in line with a previous study in which 5FU was shown to exert its cytotoxic effect through BCL2-associated X protein (Bax) activation, which is known to induce mitochondria and lysosome disruption<sup>27</sup>. In our model, we found that Bax inactivation using shRNA blunted lysosome permeabilization and caspase-1 activation in MDSCs (**Supplementary Fig. 16**), thus linking this specific mechanism of 5FU cytotoxicity on MDSCs with its capacity to trigger caspase-1 activation in these cells.

Chronic inflammation is recognized as an important event in carcinogenesis and tumor progression<sup>28–31</sup>. For example, chronic overactivation of the IL-1 $\beta$  system<sup>32</sup> has been considered a tumor-promoting condition, arguing in favor of IL-1 $\beta$  inhibition for tumor prevention or therapy<sup>33–36</sup>. In addition, IL-1 $\beta$  was previously shown to negatively regulate anticancer immune responses through its capacity to induce MDSC expansion<sup>37</sup>. In another model, the expression of Nlrp3 in the tumor microenvironment diminishes antitumor

immunity and vaccine efficacy by facilitating the migration of MDSCs to the tumor site<sup>38</sup>, thus proposing another deleterious mechanism of action of the NLRP3 inflammasome in the context of cancer. IL-1 $\beta$  was also shown to induce the generation and expansion of T<sub>H</sub>17 cells, which could promote tumor growth by signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) activation in tumor cells<sup>39</sup>. Stat3 then exerts proangiogenic functions that drive pathologic neoangiogenesis in tumors<sup>40</sup>.

In sharp contrast, we have previously shown that some anticancer chemotherapeutic agents such as anthracyclines induced a specific mode of death called immunogenic cell death<sup>41</sup>. This type of tumor-cell death elicits an immune response that requires calreticulin externalization<sup>42</sup>, high mobility group box 1 (HMGB1) secretion<sup>43</sup>, autophagy induction<sup>44</sup> and IL-1 $\beta$  signaling for the priming of anti-cancer CD8<sup>+</sup> T cells<sup>5</sup>, suggesting that acute inflammation triggered by chemotherapy is beneficial for anticancer responses. This discrepant result may be explained by the fact that 5FU and Gem do not induce immunogenic tumor-cell death<sup>9</sup>. Consequently, these drugs do not favor the cross priming of tumor antigens by dendritic cells and CD8<sup>+</sup> T cell activation. In addition, the effects of IL-1 $\beta$  may depend on its concentration. Although even at low concentrations IL-1 $\beta$  is able to enhance IL-17 production by T cells, only high concentrations drive CD8<sup>+</sup> T cell activation<sup>5,23</sup>. These data may help to explain the ambiguous role of IL-1 $\beta$  during tumor growth and treatment.

The specific mechanisms underlying the capacity of Gem and 5FU to target MDSCs remains unclear. We found that MDSCs have low expression of thymidylate synthase and cytidine deaminase, the rate-limiting enzymes that protect from 5FU- and Gem-induced cell death, respectively (Supplementary Fig. 17). In addition, the expression of these enzymes was inversely correlated with caspase-1 activation (data not shown). These data suggest that the specificity of 5FU and Gem in targeting MDSCs is the result of an enzymatic deficiency.

This report unravels a new mechanism of resistance to chemotherapy by highlighting the downside of two widely used anticancer cytotoxic agents, 5FU and Gem. Although these drugs induce MDSC killing and thus impede tumor-induced immunosuppression, they also mediate cathepsin B-dependent activation of the NLRP3 inflammasome. Consecutive IL-1 $\beta$  release promotes a state of inflammation that enhances IL-17 production and accelerates tumor growth. As caspase-1 activation in MDSCs and IL-1 $\beta$  production can also be detected in patients treated with 5FU for metastatic colon cancer, our work supports the use of inhibitors of IL-1 $\beta$  or the NLRP3 inflammasome in combination with 5FU or Gem to enhance their efficacy.

## METHODS

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

Note: Supplementary information is available in the [online version of the paper](#).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors of this work are supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (F.G.), the Association pour le Recherche Contre le Cancer (ARC) (F.G., G.M. and M.B.), the Ligue Nationale Contre le Cancer (F.V.), the Institut National du Cancer (INCa) (F.G.), the Ligue Régionale Contre le Cancer Comité Grand-Est (F.G., C.R. and L.A.), the Fondation de France (F.G.), the Agence Nationale de la Recherche (ANR, ANR-10-PDOC-014-01) (L.A.), the European Commission (Marie Curie Fellowship PCIG10-GA-2011-303719) (L.A.), the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (M.B.), INSERM et Région Bourgogne (F.C.) and LabEx ANR-11-LABX-0021. We thank P. Schneider (Biochemistry Department, Université de Lausanne), V. Bronte (Istituto Oncologico, Padova, Italy) and T. Reinheckel (Institute of Molecular Medicine and Cell Research Freiburg, Germany) for providing essential material.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.B., G.M., V.D., F.C., A.C., F.V., W.B., B.S. and C.R. performed *in vitro* experiments. M.B. and L.A. performed *in vivo* experiments. B.R., J.L.C. and J.K. provided essential materials. M.B., G.M., L.A., F.M. and F.G. designed the study and analyzed results. M.B., L.A. and F.G. wrote the paper.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2999>.

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

- Pagès, F. *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2654–2666 (2005).
- Zhang, L. *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 203–213 (2003).
- Mattarollo, S.R. *et al.* Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* **71**, 4809–4820 (2011).
- Ménard, C., Martin, F., Apetoh, L., Bouyer, F. & Ghiringhelli, F. Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1579–1587 (2008).
- 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).
- Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M. & Ostrand-Rosenberg, S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J. Immunol.* **179**, 977–983 (2007).
- Le, H.K. *et al.* Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 900–909 (2009).
- Mundy-Bosse, B.L. *et al.* Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* **71**, 5101–5110 (2011).
- Vincent, J. *et al.* 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* **70**, 3052–3061 (2010).
- Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R. & Albelda, S.M. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6713–6721 (2005).
- Apetoh, L., Vegran, F., Ladoire, S. & Ghiringhelli, F. Restoration of antitumor immunity through selective inhibition of myeloid derived suppressor cells by anticancer therapies. *Curr. Mol. Med.* **11**, 365–372 (2011).
- Ostrand-Rosenberg, S. & Sinha, P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.* **182**, 4499–4506 (2009).
- Gabrilovich, D.I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162–174 (2009).
- Nagaraj, S. & Gabrilovich, D.I. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* **68**, 2561–2563 (2008).
- Longley, D.B., Harkin, D.P. & Johnston, P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I. & Mazzei, T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann. Oncol.* **17** (suppl. 5), v7–v12 (2006).
- Gross, O., Thomas, C.J., Guarda, G. & Tschopp, J. The inflammasome: an integrated view. *Immunol. Rev.* **243**, 136–151 (2011).
- Pétrilli, V., Dostert, C., Muruve, D.A. & Tschopp, J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 615–622 (2007).
- Buttle, D.J., Murata, M., Knight, C.G. & Barrett, A.J. CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**, 377–380 (1992).
- Tschopp, J., Martinon, F. & Burns, K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 95–104 (2003).
- Dinarello, C.A. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 317–329 (2010).
- Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* **8**, 942–949 (2007).
- Chung, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* **30**, 576–587 (2009).
- Qin, H. *et al.* TGF- $\beta$  promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J. Immunol.* **183**, 97–105 (2009).
- He, D. *et al.* IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.* **184**, 2281–2288 (2010).
- Kujawski, M. *et al.* Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3367–3377 (2008).
- Wang, C. & Youle, R.J. Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. *Oncogene* **31**, 3177–3189 (2012).

## ARTICLES

28. Carmi, Y. *et al.* Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis. *J. Immunol.* **186**, 3462–3471 (2011).
29. Apte, R.N. & Voronov, E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol. Rev.* **222**, 222–241 (2008).
30. Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
31. Li, N., Grivennikov, S.I. & Karin, M. The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment. *Cancer Cell* **19**, 429–431 (2011).
32. Krelm, Y. *et al.* Interleukin-1 $\beta$ -driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res.* **67**, 1062–1071 (2007).
33. Hagemann, T., Balkwill, F. & Lawrence, T. Inflammation and cancer: a double-edged sword. *Cancer Cell* **12**, 300–301 (2007).
34. Greten, F.R. *et al.* IKK $\beta$  links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**, 285–296 (2004).
35. Naugler, W.E. *et al.* Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* **317**, 121–124 (2007).
36. Balkwill, F., Charles, K.A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* **7**, 211–217 (2005).
37. Bunt, S.K. *et al.* Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* **67**, 10019–10026 (2007).
38. van Deventer, H.W. *et al.* The inflammasome component NLRP3 impairs antitumor vaccine by enhancing the accumulation of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* **70**, 10161–10169 (2010).
39. Wang, L. *et al.* IL-17 can promote tumor growth through an IL-6–Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med.* **206**, 1457–1464 (2009).
40. Numasaki, M. *et al.* Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* **101**, 2620–2627 (2003).
41. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. & Kroemer, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 59–73 (2008).
42. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
43. Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **13**, 1050–1059 (2007).
44. Michaud, M. *et al.* Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* **334**, 1573–1577 (2011).

## ONLINE METHODS

**Mice.** For all experiments, only female mice were used. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> transgenic mice were provided by J.-L.C. *P2rx7*<sup>-/-</sup> transgenic mice were obtained from J.K. *Casp1*<sup>-/-</sup>, *Il17a*<sup>-/-</sup>, *Il1r1*<sup>-/-</sup> and ROR- $\gamma$ -GFP mice were given by B.R., and *Ctsb*<sup>-/-</sup> mice were provided by T. Reinheckel. All mice were on a C57BL/6 background. Female C57BL/6 and BALB/c mice (aged 6–8 weeks) were obtained from the Centre d'élevage Janvier and Charles River Laboratories.

**Cell lines.** MSC-2 is an immortalized MDSC cell line obtained from BALB/c Gr-1<sup>+</sup> splenocytes and was obtained here from V. Bronte (Istituto Oncologico, Padova, Italy). EL4 thymoma cells, LLC cells and B16F10 melanoma cancer cells (all syngenic from C57BL/6 mice), 4T1 mammary adenocarcinoma cancer cells (syngenic from BALB/c mice) and MSC-2 cells were cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 with 10% (v/v) FCS supplemented with sodium pyruvate, penicillin and streptomycin and 4 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES).

**Chemotherapeutic drugs.** For *in vitro* experiments, unless otherwise stated, cells were treated for 24 h with 5FU (Sanofi-Aventis) at 1  $\mu$ M, Gem (Lilly France) at 27 nM or oxaliplatin (Teva) at 2.5  $\mu$ M. For drug screening, Deticene (Sanofi-Aventis) was used at 430  $\mu$ M, paclitaxel (Bristol-Myers Squibb) at 175 nM, mitomycin C (Sigma-Aldrich) at 3  $\mu$ M and doxorubicin (Pfizer) at 73 nM.

**In vivo treatments.** To induce tumor formation, 10<sup>6</sup> EL4, 3  $\times$  10<sup>5</sup> B16F10, 10<sup>5</sup> 4T1 or 3  $\times$  10<sup>5</sup> LLC cells were injected subcutaneously into mice. All experiments were carried out in accordance with guidelines prescribed by the Ethics Committee at the University of Burgundy.

EL4 tumor-bearing mice received a single injection of 5FU at 50 mg per kg body weight or Gem at 120 mg per kg body weight 10 d after tumor-cell injection (tumor size, 100–120 mm<sup>2</sup>). B16F10 tumor-bearing mice were treated with three injections of 5FU at 50 mg per kg body weight at days 5, 7 and 9 after tumor-cell injection. 4T1 and LLC tumor-bearing mice received two injections of 5FU at 50 mg per kg body weight at days 5 and 7. For each model, we chose the minimal number of 5FU injections that would induce a delay in tumor growth in wild-type mice. Thirty micrograms of IL-1Ra (Kineret from Biovitrum) were injected three times a week beginning with the chemotherapeutic treatment at day 10. All drugs were administered intraperitoneally.

To deplete CD4 or CD8 cells, mice were injected with 250  $\mu$ g of CD4-specific (GK 1.5) or CD8-antibodies (2.43) antibodies (obtained from BioXcell) at days 0 and 3 after chemotherapeutic treatment. To deplete MDSCs, mice were injected with 200  $\mu$ g of Gr-1-specific monoclonal antibody (BE0075) from BioXcell at days -2 and -1 before 5FU injection.

**Reagents.** Cytochalasin D (C8273), oxi ATP (A 6779), CaCl<sub>2</sub> (C3881), bafilomycin A1 (B1793), LPS and ATP (A7699) were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). *N*-acetylcysteine was from Zambon, apocynin (17838) was bought from MERCK, and KCl was purchased from PROAMP. All tissue culture reagents were bought from Lonza.

**Determination of caspase-1 activity.** To assess caspase-1 activity, the FAM-YVAD-FMK fluorescent probe (Immunochemistry Technologies Bloomington) binding to cleaved caspase-1 was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, 4  $\times$  10<sup>6</sup> cells per ml were cultured for 45 min in the presence of the substrate, and cells were subsequently washed and analyzed by flow cytometry in the presence of DAPI from Sigma-Aldrich to exclude necrotic cells.

**ELISA.** Cell culture supernatants were assayed for mouse IL-1 $\beta$  (R&D Systems), IL-17a (Biolegend) IFN- $\gamma$  or IL-4 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Human sera were tested for IL-1 $\beta$  (BD Biosciences and R&D Systems) and IL-17 (Biolegend) according to the manufacturers' instructions.

**Flow cytometry analyses.** Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses on mouse cells were performed using phycoerythrin-cyanine 7 (PE-Cy7)-conjugated antibodies to Gr-1 (RB6-8C5 from ebioscience, San Diego, CA, USA), PE-conjugated antibodies to CD11c (N418 from ebioscience), Alexa Fluor 700-conjugated F4/80 (BM8 from Biolegend), allophycocyanin (APC)-conju-

gated antibodies to CD11b (M1/70 from abcam, Paris, France), DAPI, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V (from BD Pharmingen) and lysotracker (DND-26 from Invitrogen). All antibodies were diluted to 1:100.

For human cell labeling, we used APC-conjugated antibodies to CD33 (WM53), PE-conjugated antibodies to CD14 (M5E2) and peridin-chlorophyll-protein complex (PercP)-conjugated antibodies to HLA-DR (L243), all purchased from BD Pharmingen and used according to the manufacturer's protocol.

All acquisitions were performed with a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD biosciences), and all data were analyzed with FlowJo software.

**Immunoblot analysis.** Protein extracts were prepared by lysing cells in boiling buffer (1% SDS, 1 mM sodium vanadate and 10 mM Tris, pH 7.4) in the presence of complete protease inhibitors (Roche diagnostics) for 10 min at 4 °C. Viscosity of the samples was reduced by sonication. Protein concentration was measured using the Bio-Rad DC protein assay kit. Protein lysates were incubated in loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol and 0.003% bromophenol blue), heated at 95 °C for 5 min and then separated by SDS-PAGE and electroblotted to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell). After incubation for 2 h at room temperature with 5% nonfat milk or BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20 (TBS-Tween), membranes were incubated overnight with primary antibody diluted in 5% nonfat milk or BSA in TBS-Tween, washed, incubated with secondary antibody for 30 min at room temperature and washed again before analysis with luminol reagent (Santa Cruz Biotechnologies).

Rabbit polyclonal antibody to mouse caspase-1 was purchased from Invitrogen (AHZ0082, 1:1,000) or Santa Cruz (M-20, 1:200). Rat monoclonal antibody to mouse IL-1 $\beta$  was obtained from R&D Systems (166926, 1:500). Mouse monoclonal antibodies to the following were used:  $\beta$ -actin (A1978, 1:5,000) and VSV-G (V4888, 1:1,000) (Sigma-Aldrich) and Nlrp3 (Cryo2, 1:1,000, Enzo Life Sciences). Goat polyclonal antibody to cathepsin B (S-12, 1:200) was obtained from Santa Cruz.

**Immunoblot analysis of mice serum.** Two-hundred microliters of mouse serum was immunoprecipitated using rat monoclonal antibody to mouse IL-1 $\beta$  (166926, 1:125, R&D Systems) and analyzed using immunoblot analysis.

**Cell proliferation assay.** For the cell proliferation assay, 4T1, B16, LLC or EL4 cells were seeded at 1  $\times$  10<sup>4</sup> cells per well in a 96-well plate. To assess the impact of IL-1 $\beta$  on tumor-cell survival after 5FU treatment, cells were treated for 24 h with IL-1 $\beta$  (200 pg ml<sup>-1</sup>) before receiving 5FU. Two days after 5FU treatment, cell survival was determined by crystal violet staining for 4T1, B16 and LLC cells and flow cytometry using annexin V and DAPI staining for EL4 cells.

**Confocal microscopy.** Cells were cultured on glass in complete medium. They were fixed and permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm buffer (BD bioscience) and saturated with BD Perm/Wash containing 5% BSA. The primary antibodies used were rat antibodies to mouse CD107a (SC71488, 4  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, Santa Cruz Biotechnology) and goat antibodies to mouse cathepsin B (SC6493, 4  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, Santa Cruz), and the secondary antibodies used were antibodies to rat Alexa 488 (1:1,000) and antibodies to goat Alexa 594 (1:1,000) from Invitrogen. Samples were observed with a LEICA TCS SP2 microscope (Leica microsystem SAS). Pictures were merged using ImageJ.

**Recombinant proteins.** Recombinant human NLRP3 protein (H00114548-P01) was obtained from Abnova, and recombinant human cathepsin B (953-CY) and mouse cathepsin B (965-CY) were purchased from R&D Systems.

To synthesize recombinant mouse Nlrp3 and VSV-tagged recombinant mouse Nlrp3 deleted in the PYD or the NACHT or LRR domain, we used the TNT T7 quick-coupled transcription/translation system from Promega according to the manufacturer's instructions.

**Plasmid constructs.** The sequence coding for *Nlrp3* was inserted in the pCR3-VSV N-ter plasmid (kind gift from P. Schneider). *Nlrp3* deleted in the PYD or the NACHT or LRR domain were generated by site-directed mutagenesis with

the GeneTailor mutagenesis system (Invitrogen). The sequences of the oligonucleotides used are listed in **Supplementary Table 2**.

**Knockdown of *Nlrp3*, *Ctsb* or *Bax* expression in MSC-2 cells.** MSC-2 cells were transduced with MISSION Lentiviral Transduction Particles (Sigma-Aldrich) to silence *Nlrp3*, *Ctsb* or *Bax* or with negative control particles according to the manufacturer's instructions. Briefly,  $1.6 \times 10^4$  cells were seeded in 96-well plates, and the next day, lentiviral particles (multiplicity of infection tested between 0.5 and 10) were added in the presence of  $8 \mu\text{g ml}^{-1}$  of hexadimethrine bromide (Sigma-Aldrich) for 20 h. Then the medium was removed and replaced by fresh medium containing  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  of puromycin (Sigma-Aldrich) every 3 d until obtaining resistant cells. Resistant cells transduced with control shRNA particles and others transduced with shRNA specific for *Nlrp3*, *Ctsb* or *Bax* were obtained. Downregulation of *Nlrp3*, cathepsin B and *Bax* was checked by western blotting.

**Determination of cathepsin B activity.** To assess cathepsin B activity,  $2 \times 10^5$  cells were incubated in the presence of a fluorogenic cathepsin B substrate (100  $\mu\text{M}$ , 219392, EMD chemicals) for 30 min at 37 °C. Fluorometry was then measured at 460 nm using a Wallac 1440 Victor2 luminometer (PerkinElmer).

**Experiments with Human PBMCs.** For *in vitro* experiments,  $2.5 \times 10^6$  PBMCs from patients with cancer were cultured in 200  $\mu\text{l}$  of RPMI with PBS or 5FU (40  $\mu\text{M}$ ) in the presence or absence of CA074Me at 33  $\mu\text{M}$  (205531 from Calbiochem) for 2 d. Caspase-1 activation in HLA DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> MDSCs was assessed using flow cytometry.

For *in vivo* experiments, PBMCs and sera from patients with colon cancer were obtained before and 1 d after 5FU treatment. Caspase-1 activation was determined in HLA DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> MDSCs. Experiments were approved by the local ethical committee (Institutional Review Board of the Centre Georges Francois Leclerc).

**Surface plasmon resonance analysis.** The design and fabrication of homemade chips compatible with surface plasmon resonance was performed as previously published with the help of the MIMENTO technological platform (Besançon, France)<sup>45</sup>.

Biacore experiments were performed with the Biacore 2000 apparatus at 25 °C with a flow rate of 2–30  $\mu\text{l min}^{-1}$ . Human cathepsin B and rat serum albumin (both at 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) were immobilized on chemically activated self-assembly monolayers of 11-mercapto-1-undecanol (11-MUOH) and 16-mercapto-1-hexadecanoic acid (16-MHA) (97/3 by mole). Real-time monitoring allowed the control of 10 femtomoles per  $\text{mm}^2$  of immobilized proteins in each experiment. Human NLRP3 was injected at 10 nM in PBS buffer according to the Kinject procedure (association time, 2 min; dissociation time, 3 min).

**Coculture of naive T cells with MDSCs.** Two days after PBS or 5FU treatment *in vivo*, splenic MDSCs from EL4 tumor-bearing mice (tumor size, 80–100  $\text{mm}^2$ ) and splenic CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> naive T cells from naive mice were sorted by flow cytometry with a BD ARIA cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD biosciences). Two-hundred thousand naive T cells were cultured with  $2 \times 10^5$  MDSCs in RPMI in the presence of antibodies to CD3 (5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and CD28 (5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 3 d. IL-17a production was assessed by ELISA.

**Quantitative PCR analysis.** Total RNA from T cells was extracted using TRIzol (Invitrogen). One hundred to three hundred nanograms of RNA were reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase, random primers and RNaseOUT inhibitor (Invitrogen). cDNAs were quantified by real-time PCR using a SYBR Green Real-time PCR kit (Applied Biosystems) on a Fast7500 detection system (Applied biosystems). Relative mRNA levels were determined using the  $\Delta\text{Ct}$  method. Values were expressed relative to CD3. The sequences of the oligonucleotides used are listed in **Supplementary Table 2**.

***In vitro* T cell differentiation.** Naive CD4<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>) or naive CD8<sup>+</sup> T cells (CD8a<sup>+</sup>) were isolated from spleens and lymph nodes of C57BL/6 wild-type mice using magnetic beads from Miltenyi Biotec. Naive CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with plate-bound antibodies to CD3 (145-2C11, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and CD28 (PV-1, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) in the presence of either no cytokines or IL-6 (20 ng  $\text{ml}^{-1}$ ), TGF- $\beta$  (2 ng  $\text{ml}^{-1}$ ), antibodies to IFN- $\gamma$  (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and antibodies to IL-4 (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) to obtain T<sub>H0</sub> and T<sub>H17</sub> cells, respectively. Naive CD8<sup>+</sup> T cells were stimulated with plate-bound antibodies to CD3 and CD28, and IL-12 (10 ng  $\text{ml}^{-1}$ ) was added to obtain Tc1 cells. Mouse IL-1 $\beta$  (401-ML), IL-6 (406-ML), IL-12 (419-ML) and TGF- $\beta$  (100-B) were all purchased from R&D Systems. Antibodies to IL-4 (1B11) and IFN- $\gamma$  (XMG1.2) were obtained from BioXcell.

**Bone marrow-derived dendritic cells.** Bone marrow-derived dendritic cells were propagated in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Sigma-Aldrich) supplemented with penicillin (100 UI  $\text{ml}^{-1}$ ; Gibco), streptomycin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; Gibco), L-glutamine (Gibco), 2-mercaptoethanol (50  $\mu\text{M}$ ; Sigma), 10% heat-inactivated endotoxin-free FCS (Gibco) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (20 ng  $\text{ml}^{-1}$ ; R&D Systems). Dendritic cells were used between days 10 and 12 when the proportion of dendritic cells within the culture was above 80%, as determined by coexpression of CD11c and MHC class II antigens.

**Isolation of mouse peritoneal macrophages.** Peritoneal cells were isolated by lavage with 4 ml of ice-cold PBS containing NaCl (150 mM; Sigma-Aldrich). Cells were seeded in 24-well plates in culture medium. Twenty-four hours later, the supernatant was discarded, and the adherent cells were regarded as macrophages.

**Statistical analyses.** Results are shown as means  $\pm$  s.e.m., and comparisons of datasets were performed using unpaired Student's *t* test (test group compared to control group). For human experiments, paired *t* test was used to compare samples from the same patients before and after 24 h of 5FU treatment, and Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was used to compare samples from the same patients before and 14 d after 5FU treatment. Differences in survival in the tumor growth experiments were assessed using Fisher's exact test. We performed statistical calculations with GraphPad Prism 5. All *P* values were two tailed. *P* < 0.05 was considered statistically significant for all experiments.

45. Boireau, W., Rouleau, A., Lucchi, G. & Ducoroy, P. Revisited BIA-MS combination: entire "on-a-chip" processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1121–1127 (2009).

Conclusions du premier article:

Nous avons pu voir que, dans les MDSC, le 5-FU et la Gem activent l'inflammasome NLRP3 via son interaction avec la cathepsine B, une protéine lysosomale. L'activation de l'inflammasome NLRP3 conduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , qui augmente la production d'IL-17 par les Th17 et mène au retour de la croissance tumorale (figure 25). Dans un article précédent, notre équipe a observé un effet positif sur la croissance tumorale d'un traitement par 5-FU ou par Gem lié à la capacité de ces traitements d'éliminer de façon spécifique une population immunosuppressive, les MDSC. Cependant, ces deux chimiothérapies provoquent également la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les MDSC. Des expériences réalisées en modulant la dose de chimiothérapies ne nous ont pas permis d'éliminer les MDSC sans provoquer la production d'IL-1 $\beta$  ni d'induire la production d'IL-1 $\beta$  sans tuer les MDSC. Si ces événements sont distincts, ils sont cependant indissociables.

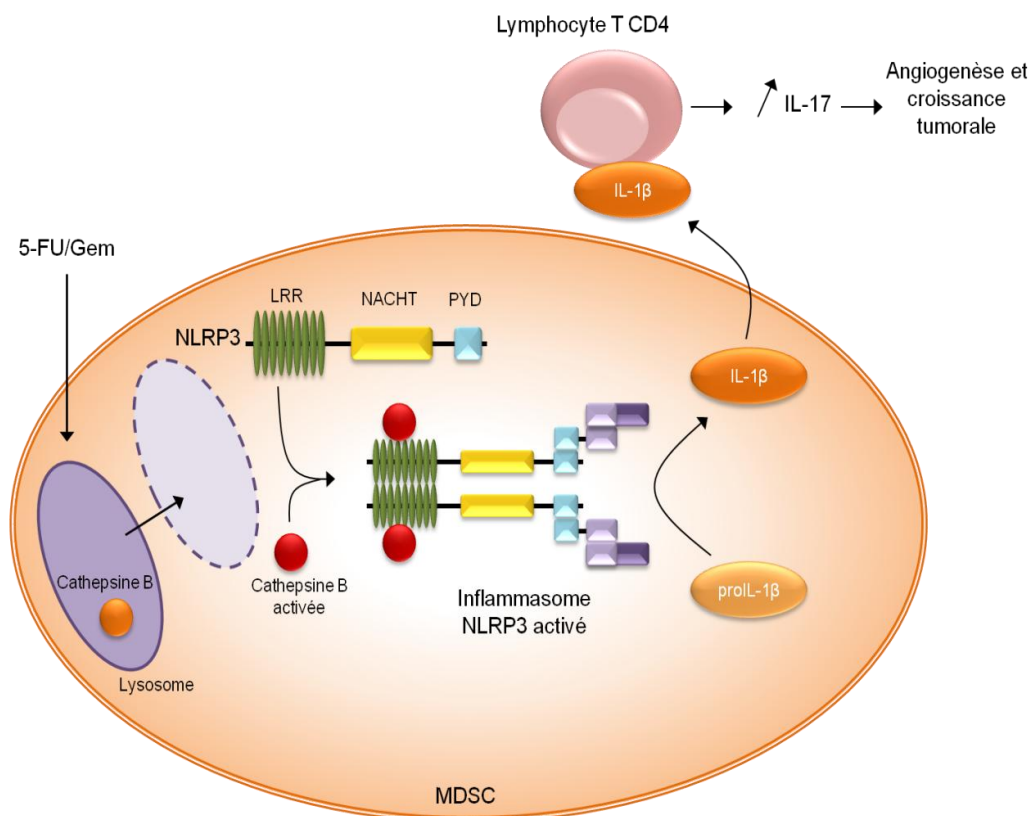


Figure 25 : Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC après traitement par 5-FU ou Gem.

Après un traitement par 5-FU ou par Gem, les lysosomes des MDSC se perméabilisent, permettant l'entrée dans le cytoplasme de la Cathepsine B. Celle-ci se lie au domaine LRR de NLRP3 et active l'inflammasome, provoquant la production d'IL-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  incite les lymphocytes T

CD4 à produire plus d'IL-17 qui, de façon indirecte, augmente l'angiogenèse et donc la croissance tumorale.

La production d'IL-1 $\beta$  a lieu en conséquence de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Celui-ci est activé grâce à une interaction directe entre la protéine NLRP3 et une protéine lysosomale, la cathepsine B. Cette interaction s'effectue via le domaine LRR de NLRP3 comme des expériences utilisant des mutants de NLRP3 ont pu nous le montrer. De plus, l'activation de NLRP3 par la cathepsine B, qui est une protéase, n'est pas due à un clivage de NLRP3 par celle-ci. La cathepsine B est libérée du lysosome après la perméabilisation de ce dernier par la protéine Bax qui est elle-même induite par les dommages causés à l'ADN par le 5-FU ou la Gem, qui sont des analogues des bases pyrimidiques.

La spécificité d'action du 5-FU et de la Gem sur les MDSC est due aux faibles taux d'expression de deux protéines, la thymidylate synthase et la cytidine deaminase, dans les MDSC. La thymidylate synthase est responsable de la synthèse de thymidine triphosphate et la cytidine deaminase est elle responsable de la conversion de la cytidine en uracile. Le 5-FU est un analogue fluoré de l'uracile, ces métabolites inhibent l'action de la thymidylate synthase et s'incorporent dans l'ADN en lieu et place de la thymidine triphosphate. La Gem est également métabolisée et ses métabolites s'incorporent dans l'ADN à la place de la cytidine triphosphate. La cytidine deaminase sert à éliminer la Gem en inactivant ses métabolites. La présence de faibles concentrations de ces deux enzymes confère aux MDSC une plus grande sensibilité à ces deux chimiothérapies. A faible dose de chimiothérapie, comme utilisée lors de cette étude, seules les MDSC ne possèdent pas assez de thymidylate synthase et de cytidine déaminase pour lutter contre ces chimiothérapies. Ce sont donc les seules cellules affectées par le traitement dans ces conditions. Les MDSC étant une population se développant lors de cancer, il serait intéressant de savoir si cette population se régénère rapidement ou si une autre population de cellules myéloïde se développe en contrepartie de l'élimination des MDSC.

L'IL-1 $\beta$  produite après traitement par 5-FU ou Gem agit sur les lymphocytes T CD4. Il va induire une augmentation de la production d'IL-17 par ces cellules. L'IL-17 est connue pour augmenter l'angiogenèse (Tartour et al., 2011). Dans nos tumeurs, une augmentation du VEGF, caractéristique de l'angiogenèse, est observée par PCR quantitative. Cette angiogenèse est responsable de la reprise



tumorale et son inhibition est l'un des moyens de maîtriser la croissance des tumeurs.

Chez l'homme, le 5-FU et la Gem sont très rarement utilisés seuls, se pose alors la question de l'impact des molécules qui leur sont associés sur la cascade d'événements décrite ici. Des études supplémentaires sont nécessaires pour décrypter les conséquences de ces co-traitements sur la sécrétion d'IL-1 $\beta$  ou l'augmentation de l'angiogenèse.

Ce travail met en avant la dualité, sur le système immunitaire, de l'effet de certaines chimiothérapies couramment utilisées dans le traitement du cancer. Il révèle un nouveau mécanisme de résistance aux chimiothérapies provoqué par les chimiothérapies elles-mêmes. L'inhibition de l'IL-1 $\beta$ , en association avec un traitement par 5-FU ou par Gem, qui augmente significativement l'efficacité de ces traitements chez la souris semble être une voie prometteuse pour l'amélioration des traitements anticancéreux chez l'Homme.

## B. Article 2

« NLRP3 protein is a transcriptional regulator of Th2 differentiation »

Soumis dans Nature, Octobre 2013

NLRP3, et l'inflammasome qu'il forme, est principalement étudié dans les cellules myéloïdes pour son rôle dans l'inflammation. Son activation, comme étudiée dans le premier article, peut être un facteur limitant l'efficacité de certaines chimiothérapies. La biologie de NLRP3 a été développée dans les cellules myéloïdes mais rien n'est connu sur sa biologie dans les cellules lymphoïdes. Nous avons ici étudié le rôle de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4 et plus particulièrement dans la différenciation des lymphocytes Th2. NLRP3 influence la différenciation Th2 de façon indépendante du reste de l'inflammasome.

Nous avons observé une augmentation de la quantité de NLRP3 dans les lymphocytes après activation de leur TCR. Cette activation induit la production d'IL-2 qui active STAT5 de façon autocrine qui est lui-même responsable de l'augmentation de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4.

En l'absence de NLRP3, les lymphocytes polarisés *in vitro* en Th2 produisent moins d'IL-4. Nous avons découvert que NLRP3 est capable d'interagir avec IRF4, un facteur de transcription connu pour activer l'expression du gène codant pour l'IL-4. En l'absence de NLRP3, IRF4 ne se lie plus au site promoteur du gène codant pour l'IL-4 et provoque une transcription plus faible de ce gène, résultant en une production moindre d'IL-4.

*In vivo*, nous avons pu observer dans des modèles de cancer de mélanome ou de cancer bronchique que l'absence de NLRP3 diminue le nombre d'implants pulmonaires tumoraux et que les lymphocytes drainants la tumeur sécrètent moins d'IL-4 que ceux provenant de souris sauvages. L'injection de Th2 sauvages avec les cellules cancéreuses dans des souris déficientes pour NLRP3 augmente le nombre d'implants pulmonaires tumoraux au niveau de celui observé chez les souris sauvages.

Ces résultats prouvent que NLRP3 est un régulateur transcriptionnel d'IRF4 dans les Th2 et qu'il pourrait être une cible lors de thérapies visant à diminuer la réponse Th2.

Les données supplémentaires relatives à cet article constituent l'annexe 3.

## **NLRP3 protein is a transcriptional regulator of Th2 differentiation**

Mélanie Bruchard<sup>1,2</sup>, Valentin Derangère<sup>1,2,3</sup>, Frédérique Vegran<sup>1,3</sup>, Romain Boidot<sup>3</sup>, Arlette Hamman<sup>2</sup>, Fanny Chalmin<sup>1</sup>, Angélique Chevriaux<sup>3</sup>, Emeric Limagne<sup>1,2</sup>, Hélène Berger<sup>1,2</sup>, Grégoire Mignot<sup>1,3</sup>, Lionel Apetoh<sup>1,3</sup>, Cédric Rebé<sup>1,3</sup>, François Ghiringhelli<sup>1,2,3</sup>

<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

### **Corresponding authors, Requests for reprints:**

Pr François Ghiringhelli : Centre de Recherche, 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](mailto:fgiringhelli@cgfl.fr)

**Abstract:**

**NOD-like receptor (NLR) family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) is a molecular adaptor involved in the formation of a macromolecular complex called inflammasome that regulates caspase-1 activation and the release of activated caspase-dependent cytokines, including interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18. NLRP3 function was mainly studied in myeloid cells and NLRP3 inflammasome activation in this cell subset had been associated with enhanced inflammation in many models. However, whether NLRP3 can shape immunological functions independently of the inflammasome remains unclear. Here, we show that NLRP3 transcriptionally affects T helper 2 cell differentiation without activation of the inflammasome. In particular, we observed that TCR triggering induces NLRP3 expression in lymphoid CD4<sup>+</sup> T cells in a STAT5 and IL-2 dependent manner without caspase-1 activation. Strikingly, *Nlrp3*-deficient naïve CD4<sup>+</sup> T cells differentiated under Th2 polarizing conditions featured reduced IL-4 secretion and impaired Th2 programs compared to wild-type cells. In Th2 cells, NLRP3 physically interacts with IRF4, a transcription factor known to promote *Il4* gene expression, and facilitates IRF4 binding to the *Il4* promoter and *Il4* gene transcription. *In vivo*, in mouse cancer models, *Nlrp3* but not *Asc* or *Caspase-1* deficiency decreases IL-4 secretion from tumor draining lymph node CD4<sup>+</sup> T cells and prevents tumor growth of transplantable melanoma or lung cancer as well as carcinogen induced lung cancer. Adoptive transfer of wild-type but not *Nlrp3* deficient Th2 cells in *Nlrp3* deficient mice also promotes tumor growth in an IL-4 dependent manner. Such results indicate that NLRP3 is a transcriptional regulator of IRF4 in Th2 cells and could be a pharmacological target of the Th2 program and to enhance antitumor immune responses.**

One important family of pattern-recognition receptors includes intracellular NOD-like receptors (NLRs) that detect the presence of intracellular invaders or autologous danger signals. Distinct NLRs are key components for the assembly of inflammasomes, multiprotein platforms responsible for the maturation of bioactive IL-1 $\beta$  and IL-18 in myeloid cells<sup>1</sup>. In order to investigate whether NLRP3 could have a role in other immune cell subsets, we interrogated NLRP3 expression in naïve and differentiated CD4<sup>+</sup> T cells. We kinetically examined *Nlrp3* induction in developing CD4<sup>+</sup> T cells. TCR stimulation induced *Nlrp3* mRNA expression after 12 and 48 hours in Th0, Th1 and Th2 differentiation conditions (Fig 1A). At the protein level, we found that while naïve T cells did not express NLRP3, CD4<sup>+</sup> T cells polarized into Th0, Th1 or Th2 cells featured modest but significant levels of NLRP3 in comparison to macrophages (Fig 1B). This NLRP3 expression is detected after 1 day of differentiation and is maintained during the first and the second round of differentiation with a strongest expression in activated CD4<sup>+</sup> T cells after an additional three-day second round of differentiation (Fig 1B). ASC and pro-Caspase-1 protein were also detected in CD4<sup>+</sup> T Cells but their expression is not affected by TCR stimulation (Fig 1B). To determine if the induction of NLRs expression during T cells differentiation is restricted to NLRP3, we compared mRNA expression of all NLRs adaptors in naïve CD4<sup>+</sup> T cells and in CD4<sup>+</sup> T cells after 12 hours of TCR triggering and stimulation under Th0, Th1 and Th2 polarization. This experiment unraveled that TCR triggering did not affect expression of other NLRs at the exception of an increase of *Nlrp6* expression (SD1). NLRP3 is a classical adaptor used for inflammasome activation. While TCR triggering induces NLRP3 expression, we tested if NLRP3 expression was sufficient to induce inflammasome activation and caspase-1 processing in CD4<sup>+</sup> T cells. We observed that neither TCR triggering nor combination of TCR triggering and extracellular ATP-i.e. a well known NLRP3 inflammasome activator-were able to activate the inflammasome and to induce caspase-1 cleavage using both FLICA-

1 labeling (SD2) or western blotting (SD3). To further document the role of TCR stimulation in the control of *Nlrp3* expression, we isolated naïve CD4<sup>+</sup> T cells that were stimulated *in vitro* with increasing doses of anti-CD3 or anti-CD3 plus anti-CD28. We observed a correlation between *Il2* and *Nlrp3* mRNA expression (Figure 1C and SD4). However, to our surprise, in the CD4<sup>+</sup> T cell clone EL4, *Nlrp3* mRNA and protein expression is induced by PMA and ionomycin stimulation but not by TCR triggering (SD5 and SD6). Unlike CD4<sup>+</sup> T cells, in EL4 clones, activation of STAT5, the downstream target of IL-2, was only observed with PMA plus ionomycin stimulation but not after anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation (SD7). Altogether, these two experiments made us suggest that the presence of NLRP3 is related to STAT5 activation status and IL-2. IL-2 inhibition using blocking mAb blunted the capacity of TCR triggering to induce *Nlrp3* mRNA expression in CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 1D) and IL-2 stimulation was able to trigger *Nlrp3* expression in a dose dependant way in naïve CD4<sup>+</sup> T cell after 12 hours (Figure 1E). Bioinformatic analysis found one putative STAT5 binding sites on the *Nlrp3* promoter (Figure 1F). Chromatin immunoprecipitation of STAT5 in activated CD4<sup>+</sup> T cells demonstrated that anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation enhanced STAT5 binding on the *Nlrp3* promoter (Figure 1G). In addition, *Stat5* gene silencing abolished the capacity of TCR triggering to induce *Nlrp3* mRNA expression in CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 1H) thus demonstrating that IL-2 and its downstream signaling molecule STAT5 dictate NLRP3 expression in CD4<sup>+</sup> T cells.

Previous reports underline that IL-2 and STAT5 are required for Th2 differentiation but not for Th1 differentiation<sup>2,3</sup>. As these two factors dictate *Nlrp3* expression, we tested if NLRP3 expression affected Th1 and Th2 cell differentiation. We compared mRNA expression of both *Il4* and *Ifnγ*, in wild type or *Nlrp3* deficient CD4<sup>+</sup> T cells differentiated into Th1 and Th2 cells. After 3 days of differentiation, we observed a reduced expression of *Il4* mRNA in *Nlrp3* deficient Th2 but no influence on *Ifnγ* mRNA expression in *Nlrp3*

deficient Th1 cells (Figure 2A). Such difference was maintained after a second round of stimulation (SD8). Same results were observed using wild-type Th2 cells transfected with siRNA preventing NLRP3 expression (Figure 2B). In contrast, *Caspase-1* or *Asc* deficiency did not impact on *Il4* or *Ifn $\gamma$*  expression in both Th1 and Th2 cells (not shown). These results underscore that NLRP3 affects Th2 cell differentiation independently of inflammasome activation. To better characterize the molecular state associated with the functional differences between wild-type and *Nlrp3* deficient Th2 cells, we assessed the mRNA profiles of *in vitro*-differentiated Th2 cells by whole-genome RNA sequencing. We compared the gene-expression profiles of naive CD4<sup>+</sup> T cells from *Nlrp3* deficient or wild-type mice differentiated into Th2 cells after one or two rounds of stimulation. As a control, we used wild type Th2 cells for baseline gene induction. We found 168 genes with a difference in expression, that were upregulated or downregulated at least two fold, in *Nlrp3* deficient Th2 cells relative to their expression in the control wild-type Th2 cells after the first round of stimulation and 238 after the second round of stimulation (Figure 2C and Table 1 and 2). After a first round of stimulation, *Nlrp3* deficient and wild type Th2 cells have comparable transcriptional profile concerning Th2 associated genes; however, a major difference lies in the *Il4* gene expression at this point. In contrast, most of the Th2 associated genes were down regulated after a second round of stimulation in *Nlrp3* deficient mice, suggesting that *Nlrp3* deficiency directly affects *Il4* mRNA production as a first event and then down regulates the whole Th2 program probably because of the low production of IL-4 which is essential for a full Th2 differentiation. As a control, we did not detect difference in *Il4r* expression in WT and *Nlrp3* deficient cells or any switch in T cells polarization (Not shown). We confirmed RNA sequencing data using RT-PCR. We observed that only *Il4* and not other Th2 related genes (*Ccr3*, *Ccr4*, *Il4r*, *Gata3*, *c-maf*, *Il5*, *Il13*) were down regulated after first round of stimulation in *Nlrp3* deficient CD4<sup>+</sup> T cells. In contrast these genes were down-regulated after

the second round of stimulation in *Nlrp3* deficient CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2D). In line with our gene expression data, no induction of Th1 or Th17 or Treg related genes were observed (not shown) suggesting that NLRP3 deficiency did not induce transdifferentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. We also verified that *Nlrp3* deficient Th2 cells secreted less IL-4 than wild-type Th2 cells whereas *Nlrp3* deficient Th1 cells secreted the same amount of IFN- $\gamma$  than wild-type Th1 cells using both ELISA (Figure 2E) and intracellular staining (Figure 2F). IL-5 and IL-13 secretion detected using ELISA were down regulated only after a second round of Th2 stimulation (SD9). Together, these results underline the capacity of NLRP3 to control the whole Th2 transcriptional program. To go further in the mechanistical explanation of the transcriptional effect of NLRP3, we looked at its cell localization in CD4<sup>+</sup> T cells. Using epifluorescence microscopy, we unraveled that the NLRP3 protein is also located mainly in the nucleus of Th2 cells whereas we observed its preferential cytoplasmic localization in macrophages cells (Figure 2G). The presence of the NLRP3 protein in the nucleus and its capacity to rapidly regulate *Ii4* mRNA production made us wonder that NLRP3 may regulate *Ii4* production at the transcriptional level.

IRF4 is one of the main genes involved in the transcriptional regulation of IL-4 production in Th2 cells<sup>4</sup>. We hypothesized that NLRP3 may regulates *Ii4* expression by a direct interaction with IRF4. We first detected a physical interaction between IRF4 and NLRP3 in activated EL4 CD4<sup>+</sup> T cell clones using immunoprecipitation (Figure 3A). We also observed this interaction between NLRP3 and IRF4 in Th2 differentiated cells (Figure 3B). As a control we did not detect any interaction between NLRP3 and GATA-3 which is also involved in *Ii4* transcription (SD10). Using proximity labeling assay as a functional immunoprecipitation, we only detected an interaction between IRF4 and NLRP3 in Th2 cells and most of the interacting dots are located in the nucleus (Figure 3C). In contrast, NLRP3 is mostly located in the cytoplasm of macrophages and in these cells, IRF4 and NLRP3 interacting dots are



mostly located in the cytoplasm (SD11). MatInspector software identified 3 putative binding sites for IRF4 located at -81-86, -278-283, -1521-1526 (IRF4bs1,2,3) bp upstream of the transcription initiation site of *Il4* gene (SD12). Using IRF4 Chromatin immunoprecipitation assay, binding of IRF4 on the IRF4 bs3 on the *Il4* promoter was detected in wild-type Th2 cells but was significantly weaker in *Nlrp3* deficient Th2 cells (Figure 3D). Similarly, NLRP3 chromatin immunoprecipitation assay also revealed an interaction of NLRP3 with the IRF4 bs3 on the *Il4* promoter in wild-type Th2 cells (Figure 3E). As a control, neither NLRP3 nor IRF4 interact with the IRF4 bs3 on the *Il4* promoter in Th1 cells (SD13). Interestingly, NLRP3 binding on the IRF4 bs3 on the *Il4* promoter was inhibited by IRF4 SiRNA, suggesting that NLRP3 bound on the *Il4* promoter only in the presence of IRF4 (Figure 3F). To test whether NLRP3 could directly enhance IRF4 capacity to activate *Il4* expression, we cloned the *Il4* promoter (of 3444bp) into pGl3-basic luciferase reporter plasmid. Transfection of IRF4 expression plasmid modestly induced the transactivation of the *Il4* promoter. NLRP3 expression plasmid alone has no effect. In contrast, co-transfection of NLRP3 and IRF4 expression plasmids strongly enhanced the transactivation of the *Il4* promoter in a dose dependent manner (Figure 3G). Together, these data support that NLRP3 directly interact with IRF4 and is required for optimal IRF4 dependent *Il4* transcription.

*In vivo*, IL-4 is known to be implicated in the promotion of tumor growth<sup>5,6</sup>. In B16F10 lung tumors, CD4<sup>+</sup> T cells that infiltrated mediastinal lymph nodes have a Th2 profile with higher levels of IL-4 (Figure 4A and B) and of other Th2 related genes mRNA (*c-Maf*, *Irf4*, and *Gata3*) compared to naïve mice (not shown). In contrast, in *Nlrp3* deficient mice with B16F10 lung tumors, CD4<sup>+</sup> T cells from mediastinal lymph nodes produced weaker level of IL-4 (Figure 4A and B) and expressed lower level of Th2 related genes mRNA compared to wild type mice (not shown). Same results were observed in LLC lung metastases model (Not shown). IL-4 depletion using mAb blunted lung metastases growth in both B16F10 and

LLC models (SD14 and not shown), underlining that in both models, IL-4 drives tumor progression.

Importantly, *in vivo*, B16F10 and LLC growth of lung tumors was impeded in *Nlrp3* deficient mice compared to controls (Figure 4C and D). Same results were observed in the spontaneous model of lung cancer induced by the carcinogen Urethane (Figure 4E). Because all cells are invalidated for the NLRP3 protein in these mice, we could not exclude that this effect is mediated by the abolition of the NLRP3 inflammasome in myeloid cells, however, B16F10 or LLC growth was not impeded in *Asc* or *Caspase-1* deficient mice (SD15), demonstrating that this effect is independent of the NLRP3 inflammasome activation. To determine if the effect observed in *Nlrp3* deficient mice is due to the defect of NLRP3 in CD4<sup>+</sup> T cells, we used a transfer strategy. To do so, we performed an adoptive transfer of wild-type Th2 cells or of *Nlrp3* deficient Th2 cells in *Nlrp3* deficient mice injected with B16F10 tumor cells. We observed in this setting that only the transfer of wild-type Th2 cells and not of *Nlrp3* deficient Th2 cells promoted tumor growth of B16F10 in *Nlrp3* deficient mice (Figure 4F). In addition, we could demonstrate that this effect is dependent of IL-4 because IL-4 depletion using mAb has no effect in *Nlrp3* deficient mice (SD14) and because IL-4 depletion blunted the B16F10 tumor promoting effect of adoptive transfer of Th2 cells in *Nlrp3* deficient mice (Figure 4F).

Together these data unravel a new role of the NLRP3 protein. We observed that in CD4<sup>+</sup> T cells, NLRP3 has the capacity to regulate the transcriptional program of Th2 cells by interacting with IRF4 thus inducing *Il4* transcription. We believe that this observation shows that NLRP3 should not only be viewed as an inflammasome adaptor but also as a potential transcriptional regulator. This transcriptional role of NLRP3 should be studied not only in Th2 cells but also in other cells that can express IRF4 like Th17 or Th9 cells, but also in myeloid or B cells. Alone, IRF4 has a weak capacity to bind to DNA and this effect often

requires another transcriptional factor such as BATF or PU1. Our data suggest that NLRP3 could be involved in the formation or the regulation of the transcriptional functions of these transcriptional factors. Finally, we also believe that our results could be used to generate drugs disrupting the NLRP3/IRF4 interaction which could be contemplated as Th2 modulating drugs.

## **Contributions**

**Author Contributions** M.B. carried out experiments, analysed the data and wrote the manuscript. C.R., F.V., F.C., R.B., G.M., A.H., V.D, H.B. and A.C., carried out experiments. L.A. and C.R. analysed the data. F.G. supervised the study, wrote and edited the manuscript.

## **Competing financial interests**

The authors declare no competing financial interests.

## **Corresponding authors**

Correspondence to: Francois Ghiringhelli

The RNA sequencing data sets have been deposited in the Gene Expression Omnibus database under accession numbers XXXXXXXX

## **Methods.**

### ***Mice***

Female C57BL/6 mice were obtained from the Centre d'élevage Janvier (Le Genest St Isle, France) and from Charles River Laboratories (Saint-Germain sur l'Arbresle, France). *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp-1*<sup>-/-</sup> and *ASC*<sup>-/-</sup> mice were given by Bernhard Ryffel (CNRS, Orléans, France) and were 6–8 weeks old C57BL/6 background mice of mixed gender. All experiments with mice were performed under protocols approved by the local ethical committee, and followed guidelines for use of animals in intramural research.

### ***ChIP-Seq experiments***

We used chromatin from approximately  $1 \times 10^7$  cells. The ChIPed DNA fragments were blunt-ended, ligated to adaptors, and sequenced using an Illumina 1/2G Genome Analyzer and MiSeq platform to obtain reads of 25–50 bp, depending on the platform. Sequenced reads were aligned to the mouse genome (NCBI36/mm8, February 2006 assembly) with Bowtie 0.12.4; only uniquely mapped reads were retained. The output of Bowtie was converted to BED files, which represent the genomic coordinates of each read. Reads were mapped into non-overlapping 200-bp windows, and the location of reads on positive (negative) strand was shifted  $\pm 75$  bp from its 5' start to determine the approximate centre of the DNA fragment associated with the reads. With these locations, the reads in each 200-bp summary window were counted. BedGraph files were generated and viewed using the UCSC genome browser, and we aligned the NLRP3 and IRF4 binding sites in Th2 CD4<sup>+</sup> T cells.

### ***Preparation of RNA-Seq Libraries***

mRNA was prepared from total RNA by poly-A selection and cDNA synthesis was carried out as described<sup>7</sup>. The resulting dsDNA was prepared for sequencing by ligation of Illumina sequencing adapters, selection of 225 bp fragments from a 2% agarose SizeSelect E-Gel (Invitrogen), and amplification with 15 cycles of PCR using Illumina paired-end primers. The RNA-seq libraries were sequenced with single-end 36 bp reads on an Illumina GAIIx or single-end 50 bp reads on an Illumina MiSeq. Sequence reads were mapped to the *Mus musculus* genome (version mm9) with Bowtie (version 0.12.7)

### ***Database of genes***

RefSeq gene database (mm8 revision) was downloaded from the UCSC genome browser; 24,769 genes were used for RNA-Seq analysis and genome-wide binding site distribution analysis

### ***In vitro T cell differentiation***

Naive CD4<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>) from spleens and lymph nodes of C57BL/6 wild-type or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice were sorted by Flow cytometry with BD ARIA cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The purity of isolated T cell populations routinely exceeded 95%. Naïve T cells were cultured for three days in the presence of anti-CD3 (2µg/mL) and anti-CD28 (2µg/mL) antibodies in the presence of anti-IFNγ (10µg/mL) and anti-IL-4 (10µg/mL) to obtain Th0 or of anti-IL-4 (10µg/mL) and IL-12 (10ng/mL) to obtain Th1 or of anti-IFNγ (10µg/mL) and IL-4 (10ng/mL) to obtain Th2. Anti-CD3(clone 145-2C11), anti- CD28 (clone PV-1), IL-4 (clone 1B11) and anti-IFN-γ (clone XMG.1) antibodies were obtained from BioXcell (West Lebanon, NH, USA) and IL-12 and IL-4 were purchased from R&D Systems. A second round of stimulation was done using the same cytokines cocktails plus IL-2 (100U/mL) for another three days.

### ***Experimental Cancer Models***

Wild type C57BL/6 mice or *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp-1*<sup>-/-</sup> and *ASC*<sup>-/-</sup> mice were intravenously injected with 2.10<sup>5</sup> B16F10 melanoma cells or 4.10<sup>5</sup> LLC cells. Lung tumor foci were enumerated 12 days after injection. Wild-type or *NLRP3*<sup>-/-</sup> mice received ten weekly urethane injections (1g/kg) intraperitoneally. All mice were sacrificed after four months and lung tumors were enumerated.

### ***In vivo cell transfer***

Naive T cells from WT or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice were differentiated towards Th2 cells for three days as described, then transferred into *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice previously intravenously injected with 2.10<sup>5</sup> B16F10 melanoma cells. Lung tumor foci were enumerated 12 days after injection.

### ***In vivo treatment***

Wild type C57BL/6 mice or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice, intravenously injected with  $2.10^5$  B16F10 melanoma cells, were treated with anti-IL-4 (11B11, BioXcell, 100µg / mice) at day 4 and 8 after tumor cells injection. Lung tumor foci were enumerated 12 days after injection.

### ***Cell lines***

EL4 CD4 clone cells, LLC lung cancer cells and B16F10 melanoma cancer cells (all syngenic from C57BL/6 mice) were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 with 10% (vol/vol) Fetal Calf Serum supplemented with sodium pyruvate, penicillin and streptomycin, and 4 mM HEPES. Human NIH/3T3 cells were cultured in DMEM 4.5 g/l with 10% (vol/vol) Fetal Calf Serum at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>.

### ***Western blot and immunoprecipitation assays***

Protein extracts were prepared by lysing cells in boiling buffer (1% SDS, 1 mM sodium vanadate, 10 mM Tris [pH 7.4]) in presence of complete protease inhibitors (Roche diagnostics) for 10 min at 4°C. Viscosity of samples was reduced by sonication. Protein concentration was measured using the Bio-Rad DC protein assay kit. Protein lysates were incubated in loading buffer (125 mM Tris-HCl [pH 6.8], 10% β-mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol, and 0.003% bromophenol blue), heated at 95°C for 5 min, then separated by Sodium Dodecyl Sulfate gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted to nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell). After incubation for 2 h at RT with 5% nonfat milk or BSA in Tris-buffered saline (TBS)-0.1% Tween 20, membranes were incubated overnight with primary antibody diluted in 5% non-fat milk or BSA in TBS-Tween, washed, incubated with secondary antibody for 30 min at RT, and washed again before analysis with luminol reagent (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany).

The anti-NLRP3 (Cryo2) antibody was purchased from Adipogen (Liestal, Switzerland), polyclonal anti-IRF4 was obtain from Novus Biological (Cambridge, UK). Polyclonal anti-caspase-1 was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and anti-ASC (AL177) was obtained from Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France). STAT5 (9363) antibody was from Cell Signaling.

Immunoprecipitations assays were done with at least  $1.10^7$  cells, as previously described<sup>8</sup>.

### ***Chromatin Immunoprecipitation Assay***

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed with the ChIP-IT kit (Active Motif Europe, Rixensart, Belgium) according to the manufacturer's instructions. In brief, at least  $1.10^6$  cells were fixed with 1% formaldehyde to cross-link DNA with proteins, lysed, and passed through a 26 gauge-needle to aid in nuclei release. After enzymatic digestion, DNA was immunoprecipitated with 2  $\mu$ g of Stat5, Nlrp3 or IRF4 antibodies, or 2  $\mu$ g of negative control immunoglobulin at 4°C overnight. After addition of protein G beads, the protein G/Antibody/Chromatin mixture was washed and eluted from the protein G with supplied buffers. Then, cross-link was reversed and samples were analyzed by quantitative PCR. The sequences of the oligonucleotides used are described in Table S1.

### ***ELISA***

Cell culture supernatants were assayed for mouse IL-4 and IFN- $\gamma$  (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) according to the manufacturers' instructions.

### ***Flow cytometry analyses***

FACS analyses on mouse cells were performed using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD4, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-IL4, allophycocyanin (APC)-conjugated anti-IFN $\gamma$  and 7AAD (all from BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA).

All acquisitions were performed with a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and all data were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, Oregon).

For intracellular cytokine staining, cells were cultured as described above and then stimulated for 4 hr at 37°C in culture medium containing PMA (50 ng/ml; Sigma), ionomycin (1  $\mu$ g/ml; Sigma), and Brefeldin (GolgiPlug; 1  $\mu$ l/ml; BD Biosciences). After staining for surface markers, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences), then stained for intracellular products.

### ***siRNA***

siRNA knockdown experiments were performed with validated control, Stat5, Nlrp3 or Irf4-specific siRNAs according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). In brief, naive



CD4<sup>+</sup> T cells were transfected with Transit-TKO transfection Reagent (Mirus) for 24 hours and then put in differentiation as previously described.

### ***Plasmid constructs***

The sequence coding for Nlrp3 or for Irf4 were inserted in the pCR3-VSV N-ter plasmid (kind gift from P. Shneider). The pII4 luciferase construct was obtained by inserting 3120 bp fragments of mouse Il4 gene promoter in the multicloning site of the pGl3 basic vector (Promega, Charboniere, France).

### ***Promoter-activity reporter assay***

Human NIH/3T3 cells (cultured in DMEM 4.5 g/l + glutamine + FBS at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) were transiently transfected for 48 hr with reporter plasmids with lipofectamine 2000 (Invitrogen). Luciferase was measured with the Dual Glo Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. In brief, Dual Glo Luciferase Reagent was added to the cells. After 10 min incubation, firefly luciferase was measured with a Wallac 1440 Victor2 luminometer (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). The reaction was stopped with Dual-Glo Stop and Glo Reagent for 10 min and the renilla luciferase was then measured.

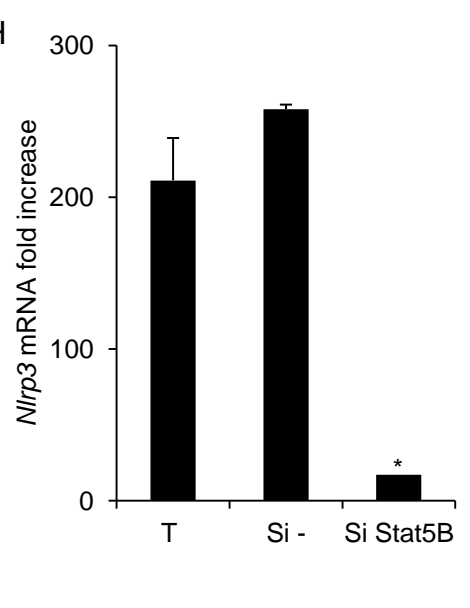
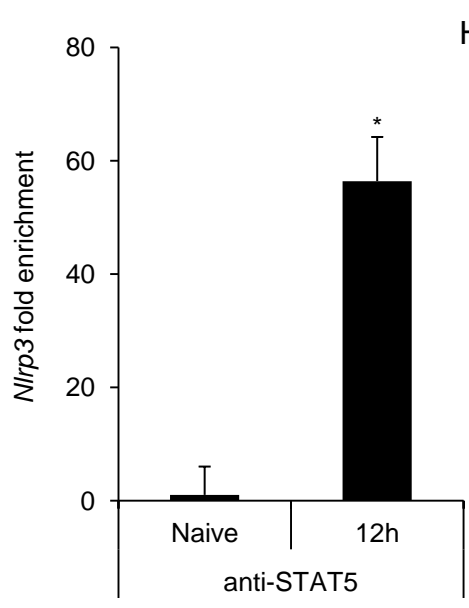
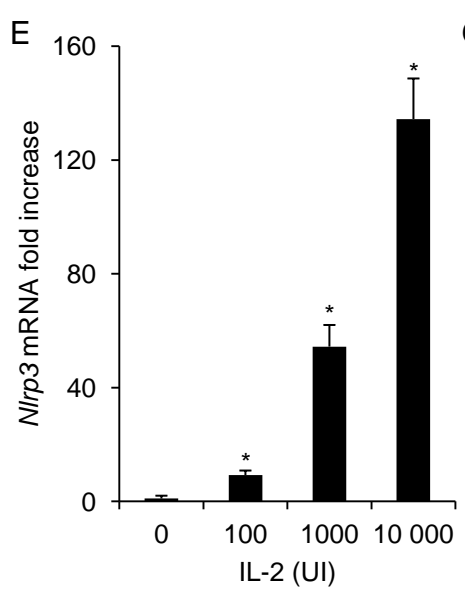
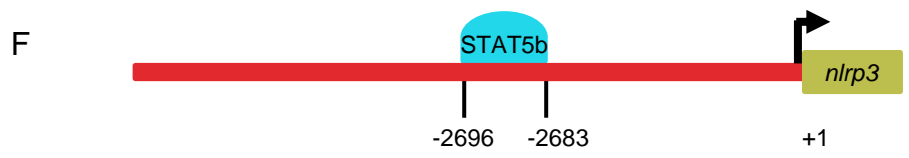
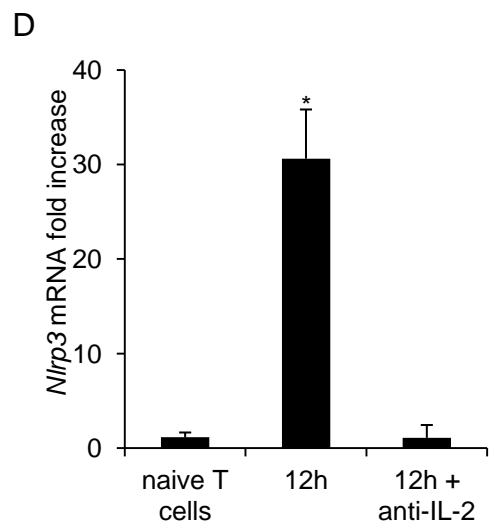
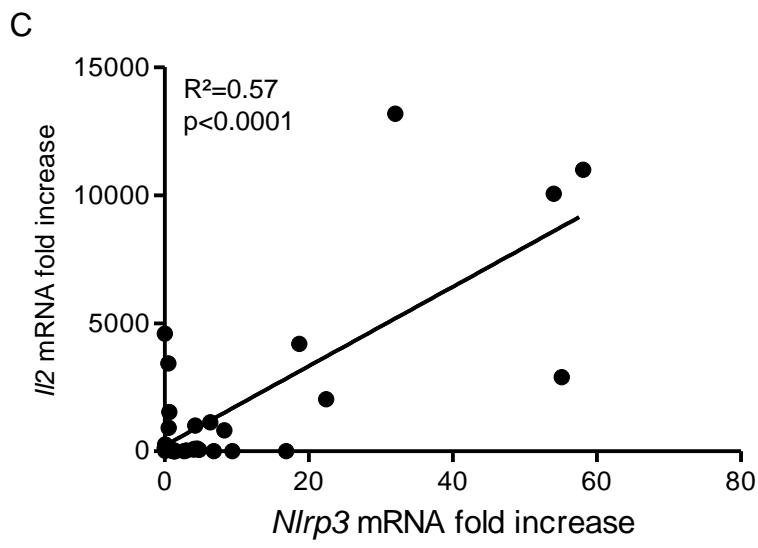
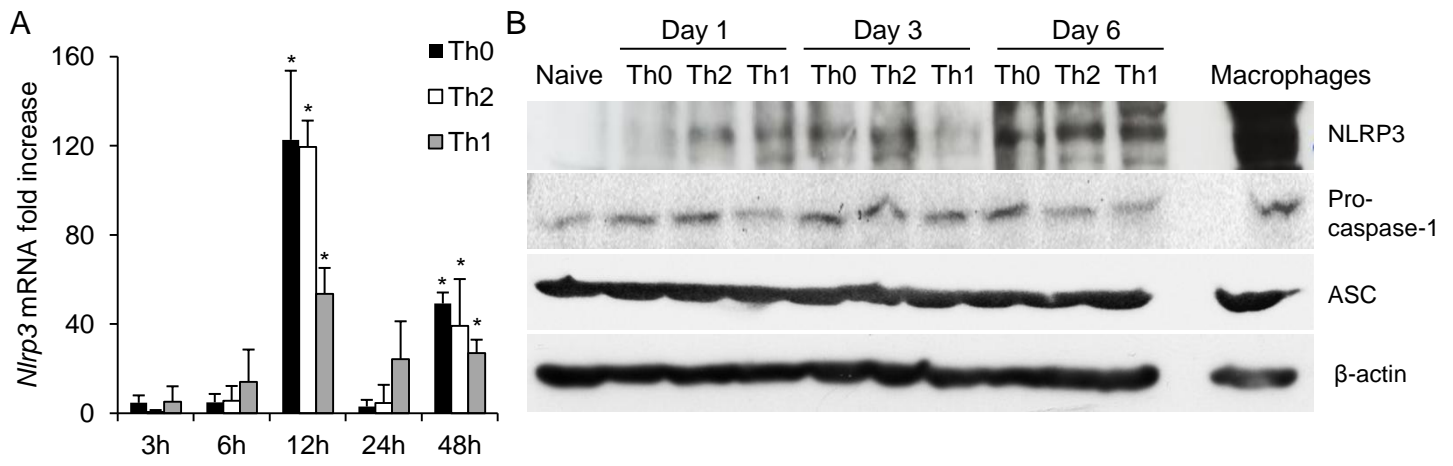
### ***Quantitative PCR analysis***

Total RNA from T cells was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 100 to 300ng of RNA were reverse-transcribed into cDNA using M-MLV reverse transcriptase, Random Primers and RNaseOUT inhibitor (Invitrogen). cDNA were quantified by real time PCR using a SYBR® Green Real-time PCR kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) on a Fast7500 detection system (Applied biosystems). Relative mRNA levels were determined using the  $\Delta$ Ct method. Values were expressed relative to  $\beta$ -actin unless otherwise specified. The sequences of the oligonucleotides used are described in Table 1.

### ***Statistical analyses***

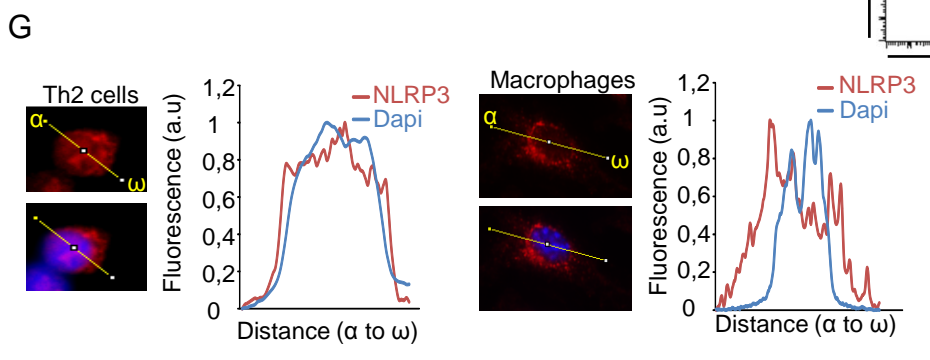
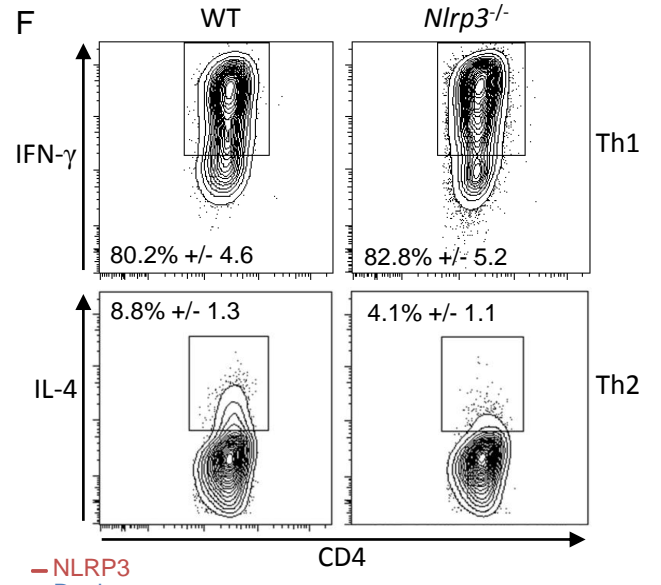
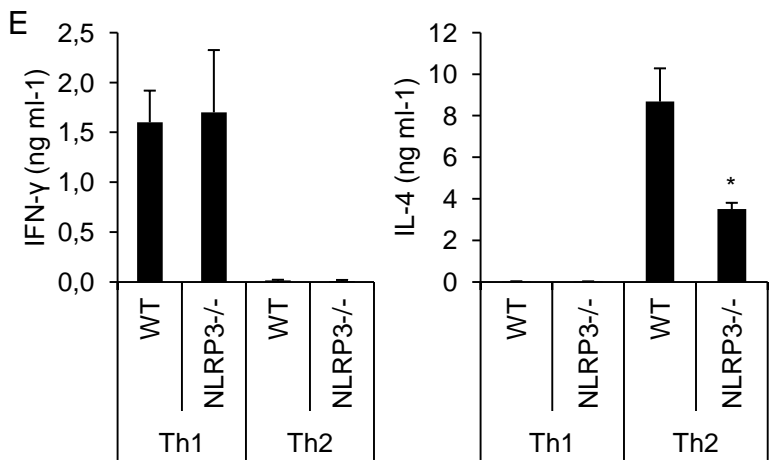
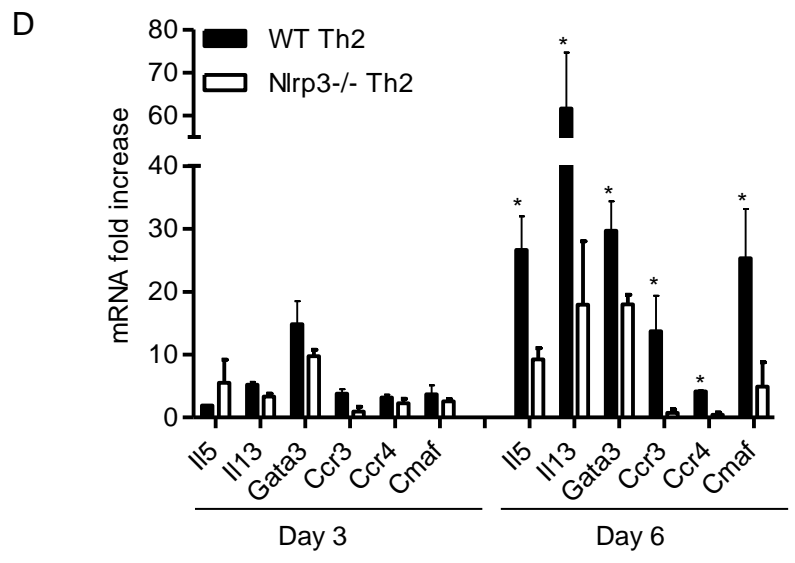
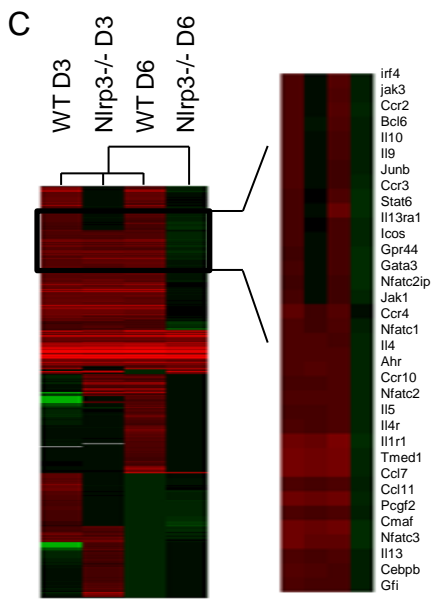
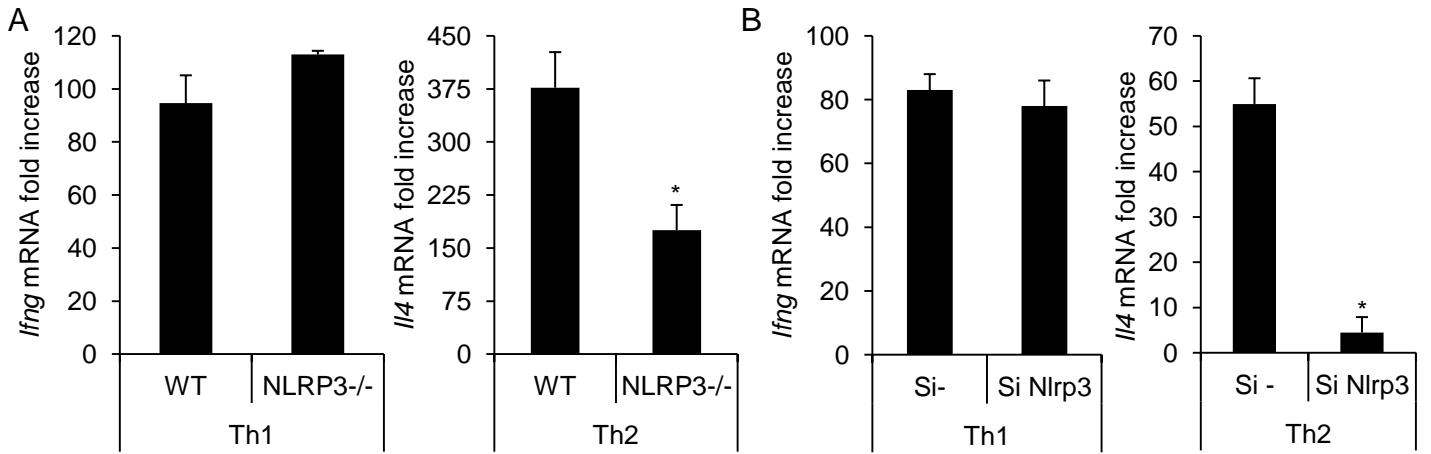
Results are shown as mean  $\pm$  SEM, and comparison of data sets was performed using unpaired Student's *t*-test (test group versus control group) or 2 ways ANOVA when suited. Differences in tumor foci numbers were assessed using Student's *t*-test or Kruskal-Wallis test according to group numbers. We performed statistical calculations with GraphPad Prism 5 (La Jolla, Ca, USA). All *P* values were two-tailed. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant for all experiments.

- 1 Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* **27**, 229-265, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715 (2009).
- 2 Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L. & Paul, W. E. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* **19**, 739-748, doi:S1074761303002929 [pii] (2003).
- 3 Cote-Sierra, J. *et al.* Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3880-3885, doi:10.1073/pnas.0400339101  
0400339101 [pii] (2004).
- 4 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).
- 5 Kobayashi, M., Kobayashi, H., Pollard, R. B. & Suzuki, F. A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *J Immunol* **160**, 5869-5873 (1998).
- 6 Hallett, M. A., Venmar, K. T. & Fingleton, B. Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13. *Cancer Res* **72**, 6338-6343, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3544  
0008-5472.CAN-12-3544 [pii] (2012).
- 7 Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**, 621-628, doi:10.1038/nmeth.1226  
nmeth.1226 [pii] (2008).
- 8 Bruchard, M. *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med* **19**, 57-64, doi:10.1038/nm.2999  
nm.2999 [pii] (2013).



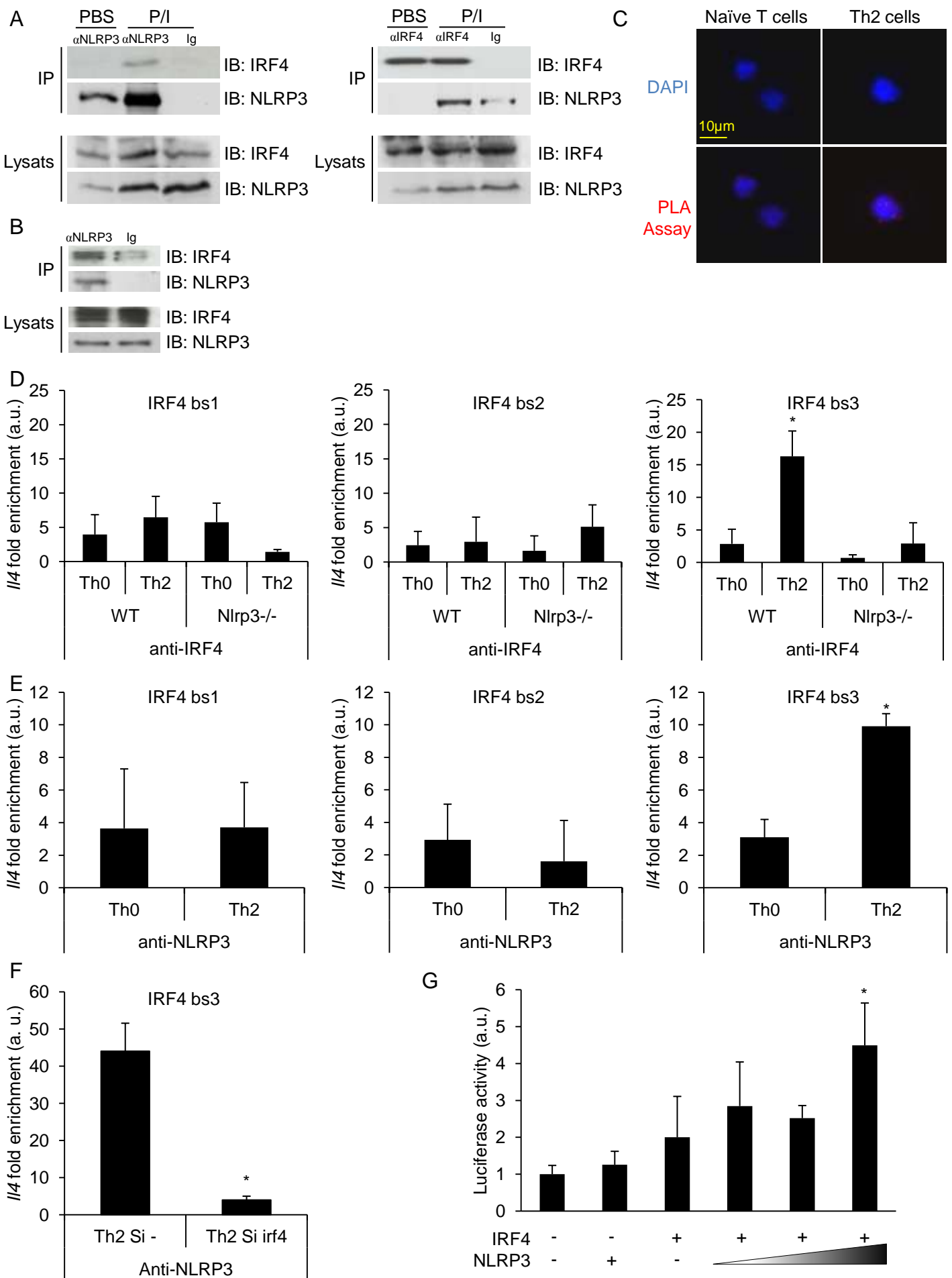
**Figure 1: IL-2 induces NLRP3 expression in CD4 T cells in a STAT5 dependent manner.**

**A**, Kinetic analysis of *Nlrp3* gene expression in activated naive wild-type CD4<sup>+</sup> T cells differentiated in Th0 or Th1 or Th2 cells. **B**, Immunoblot analysis of the proteins NLRP3, ASC and pro-Caspase-1 in wild-type (WT) CD4<sup>+</sup> T cells after 1, 3 and 6 days of differentiation in Th0 or Th1 or Th2 cells. **C**, Correlation of *Nlrp3* and *Il2* genes expression in wild-type CD4<sup>+</sup> T cells stimulated for 12 hours with a dose effect of anti-CD3 mAb in presence of anti-CD28 mAb. **D**, *Nlrp3* gene expression analysis in WT naive CD4<sup>+</sup> T cells unstimulated or activated for 12 hours with anti-CD3 and anti-CD28 mAb in the presence or absence of anti-IL-2. **E**, *Nlrp3* gene expression analysis in WT naive CD4<sup>+</sup> T cells activated for 12 hours with increasing doses of IL-2. **F**, Putative STAT5 binding site on *Nlrp3* promoter found by Bioinformatic analysis **G**. CHIP assay of the binding of STAT5 on the promoter gene region of *Nlrp3* in naive wild-type CD4<sup>+</sup> T cells activated for 12h in presence of anti-CD3 and anti-CD28 mAb **H**. *Nlrp3* mRNA expression in Th2 cells either untreated, treated with control SiRNA or STAT5 SiRNA activated for 12h in presence of anti-CD3 and anti-CD28 mAb. Data are representative of at least two independent experiments. Error bars, s.d.



**Figure 2: NLRP3 controls the production of IL-4 by Th2 and the Th2 program**

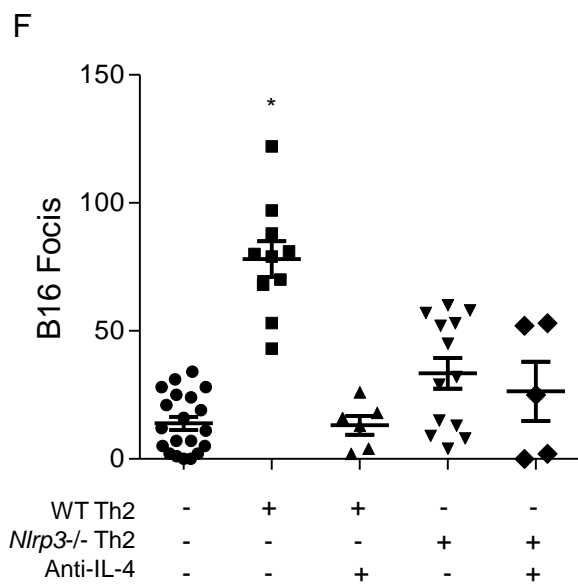
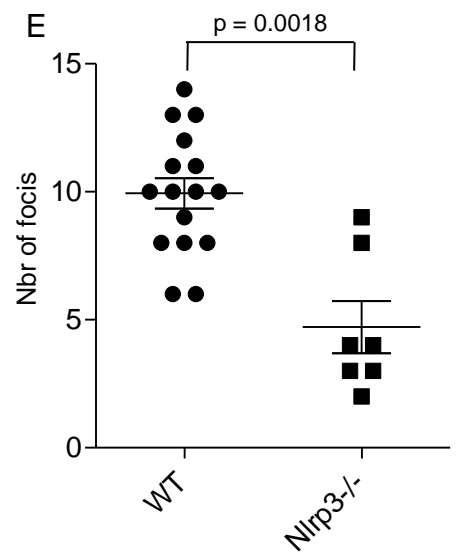
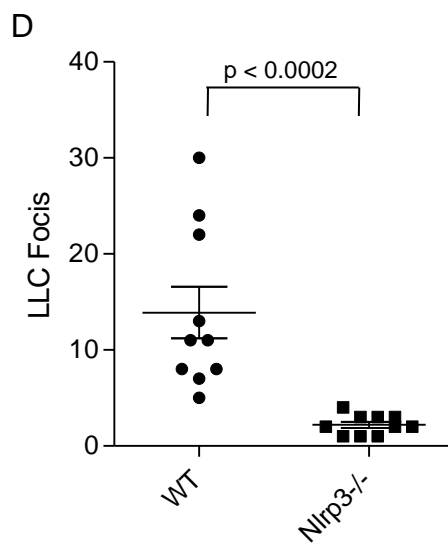
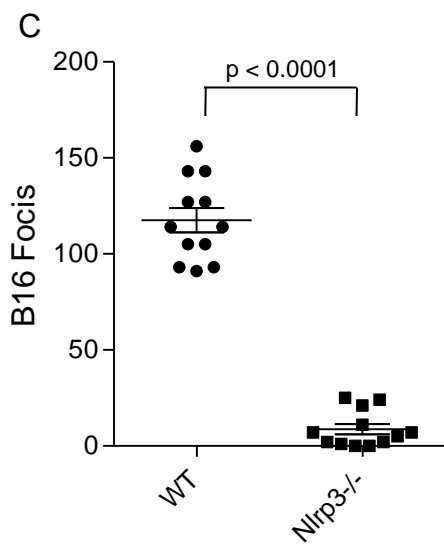
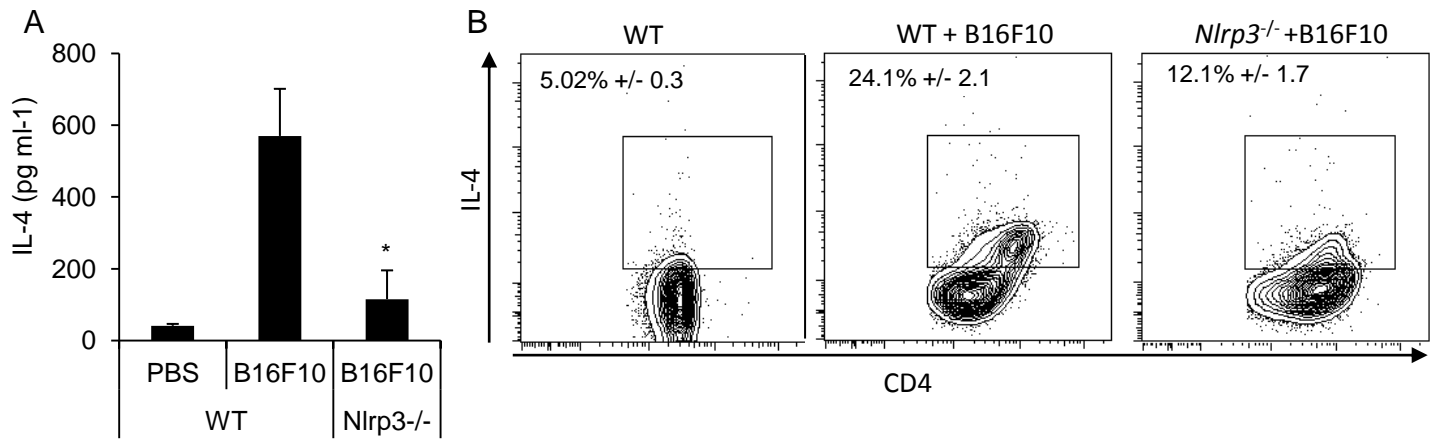
**A**, *Ifn $\gamma$*  and *Il4* mRNA expression in Th1 and Th2 cells generated after 3 days of differentiation of WT or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> naïve T cells. **B**, *Ifn $\gamma$*  and *Il4* mRNA expression in Th1 and Th2 cells generated after 3 days of differentiation with WT CD4<sup>+</sup> naïve T cells transfected with either NLRP3 SiRNA or control SiRNA. **C**, Heat map displaying RNA sequencing data, fold change of selected gene subsets in the two experimental settings: *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Th2 versus WT Th2 after 3 days of differentiation and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Th2 versus WT Th2 after 6 days of differentiation. Genes with a significant fold change in the Th2 *Nlrp3*<sup>-/-</sup> cells after 6 days of differentiation are presented. **D**, *Il5*, *Il13*, *GATA3*, *Ccr3*, *Ccr4* and *c-Maf* mRNA expression in WT or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells differentiated during 3 days (left panel) or 6 days (right panel). WT or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were differentiated in Th1 and Th2 cells and IL-4 and IFN- $\gamma$  protein expression were determined by **E**, ELISA and **F**, intracellular staining using flow cytometry. **G**, Immunofluorescence analysis of NLRP3 in Th2 WT after three days of differentiation and in macrophages. Data are representative of at least two independent experiments. Error bars, s.d.



**Figure 3: NLRP3 interacts with IRF4 and enhances its capacity to bind on the IL-4 promoter.**

Immunoprecipitation (IP) assay with anti-NLRP3 or anti-IRF4 on EL4 CD4 clone lysates stimulated with PBS or with PMA and ionomycin **A**, and of CD4<sup>+</sup> T cells differentiated in Th2 cells **B**, followed by immunoblot (IB) analysis with indicated antibodies. **C**, Proximity ligation assay (PL) between NLRP3 and IRF4 in WT naïve CD4<sup>+</sup> T cells and Th2 cells after three days of differentiation. **D**, ChIP assay of IRF4 binding to the promoter gene region of *IL-4* in wild-type or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells differentiated in Th0 or Th2 cells for one day in presence of anti-CD3 and anti-CD28 mAb and the relevant cytokines. **E**, ChIP assay of NLRP3 binding to the IRF4 binding sites of the promoter gene region of *Il4* in wild-type CD4<sup>+</sup> T cells differentiated in Th0 or Th2 cells for one day in presence of anti-CD3 and anti-CD28 mAb and the relevant cytokines and **F**, in WT Th2 previously treated with Control SiRNA or IRF4 SiRNA. **G**, *Il4* promoter activity was measured in NIH-3T3 cells transfected with an *Il4* promoter-driven luciferase reporter along with IRF4 and NLRP3 expression plasmids. Data are representative of at least two independent experiments. Error bars, s.d





**Figure 4: Implication of NLRP3 deficiency in Th2 polarization and tumor growth.**

WT and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice were injected intravenously with PBS or B16F10 cells and IL-4 protein expression were determined in mediastinal lymph nodes 12 days after PBS or B16F10 injections by **A**, ELISA and **B**, intracellular staining using flow cytometry. Number of tumor foci in lung of WT and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice 12 days after intravenous injections of **C**, B16F10 melanoma cells, **D**, LLC lung carcinoma. and **E**, injected intraperitoneally with Urethane. **F**, Number of B16F10 foci in lung of *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice 12 days after intravenous injection of B16F10 and Th2 differentiated from WT or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> naïve T cells and treated or not with anti-IL-4 at day 4 and 8 after B16F10 injection. Data are representative of at least two independent experiments. Error bars, s.d.

Conclusions du second article :

Les résultats obtenus dans cette étude mettent en avant un nouveau rôle de NLRP3 : un rôle de régulateur transcriptionnel. Ce rôle est effectué de façon indépendante des autres protéines de l'inflammasome, alors que NLRP3 est presque toujours observé dans le complexe multiprotéique formant l'inflammasome. Nous avons vu que NLRP3 est nécessaire à une transcription efficace du gène codant pour l'IL-4, son absence diminuant l'expression de ce gène. De plus, NLRP3 interagit avec IRF4, un facteur de transcription qui se fixe sur le promoteur du gène codant pour l'IL-4 et induit sa transcription. En l'absence de NLRP3, IRF4 est incapable de se lier au promoteur du gène codant pour l'IL-4 (figure 26).

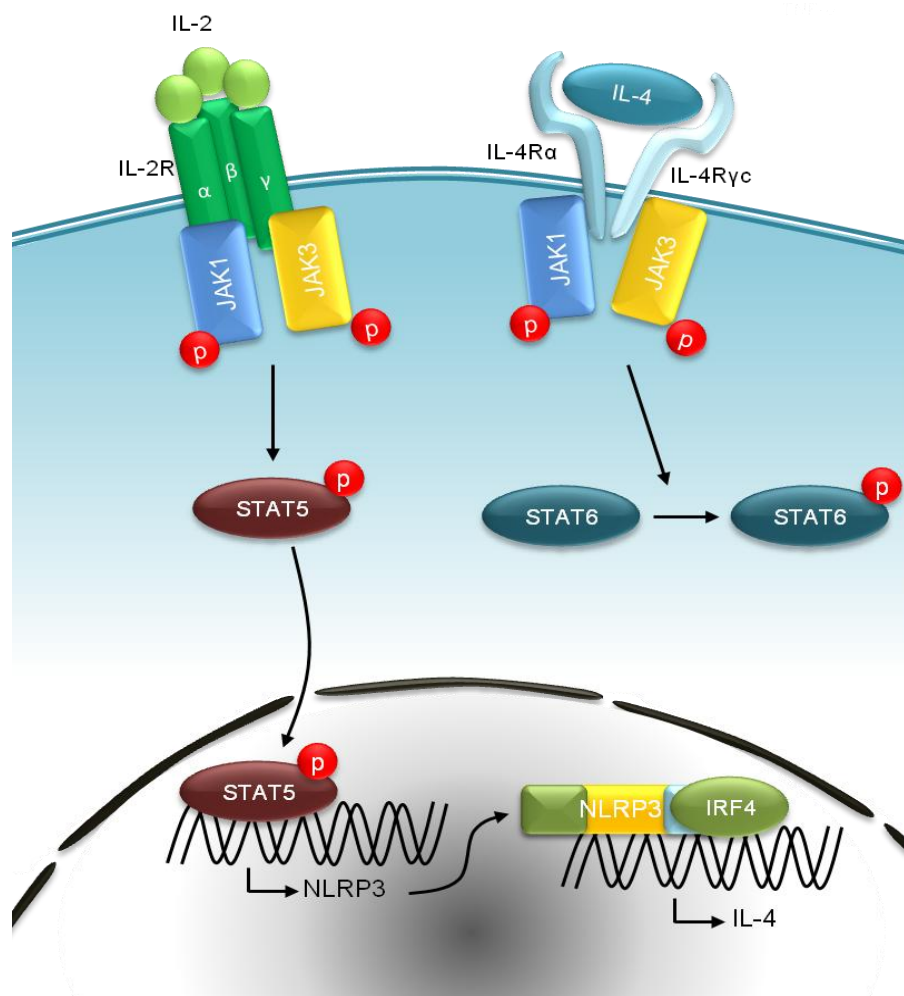


Figure 26 : Rôle de NLRP3 dans la différenciation Th2.

En se liant à son récepteur, l'IL-2 active la phosphorylation de STAT5 via JAK1 et JAK3. STAT5 phosphorylé migre dans le noyau où il active la transcription du gène codant pour NLRP3. Une fois produit, NLRP3 interagit avec IRF4 et active la transcription du gène de l'IL-4, permettant la mise en place d'une boucle d'auto-amplification des Th2.

Si les fonctions transcriptionnelles des NLR sont peu étudiées, NLRC5 et CIITA sont également connus pour jouer un rôle dans la transcription des gènes codants pour les protéines du CMH I et II respectivement (Cycon et al., 2013; Kobayashi and van den Elsen, 2012). NLRP3 ne devrait donc plus seulement être étudié pour ses fonctions liées à l'inflammasome mais également pour celles liées à sa localisation nucléaire et son interaction avec IRF4. De plus, Une étude récemment publiée révèle que CIITA est également capable d'interagir avec IRF4 (Pan et al., 2013). Les différents IRF jouant des rôles essentiels dans la différenciation de plusieurs sous-types de lymphocytes T CD4, il serait intéressant d'étudier leurs possibles interactions avec NLRP3 ou même d'autres NLR.

L'expression de NLRP3 est induite par l'IL-2 et STAT5, qui est un événement précoce ayant lieu dans tous les sous-types de lymphocytes T CD4 après activation du TCR, comme observé ici avec les Th0, les Th1 et les Th2, il serait alors intéressant d'étudier les potentiels rôles de NLRP3 dans les différents sous-types de lymphocytes T CD4.

Au niveau clinique, l'utilisation d'inhibiteurs de NLRP3, ou de la liaison NLRP3/IRF4 pourrait aider à contrôler et limiter les réponses Th2 indésirables comme dans l'asthme ou le cancer.

# Discussion

## A. Importance de l'activation de l'inflammasome NLRP3 après un traitement par chimiothérapie.

Dans un premier temps, j'ai étudié l'effet de deux chimiothérapies, le 5-Fluorouracile (5-FU) et la Gemcitabine (Gem), sur une population de cellules immunosuppressives, les MDSC. Dans ces cellules, le 5-FU et la Gem provoquent une activation de l'inflammasome NLRP3 qui produit alors de l'IL-1 $\beta$ . Cette IL-1 $\beta$  agit sur les lymphocytes T CD4 en augmentant leur production d'IL-17 qui, en conséquence, augmente l'angiogenèse et favorise la croissance tumorale.

Le 5-FU et la Gem sont capables d'éliminer spécifiquement les MDSC sans affecter les autres cellules du système immunitaire ni les autres cellules de l'organisme. Cette spécificité vient de la faible teneur des MDSC en deux enzymes, la thymidylate synthase et la cytidine déaminase. La thymidylate synthase est responsable de la synthèse de thymidine triphosphate, essentielle à la synthèse d'ADN. L'un des métabolites du 5-FU est capable de bloquer cette enzyme. Dans les MDSC, une faible dose de 5-FU est suffisante pour la bloquer à cause de sa faible expression, alors que dans les cellules exprimant plus de thymidylate synthase, une faible dose de 5-FU diminuera la synthèse de thymidine triphosphate mais ne l'abolira pas, permettant la survie de la cellule. La cytidine déaminase transforme la cytidine présente dans la Gem en uracile qui peut ensuite être expulsée des cellules, permettant ainsi la survie de ces cellules. Cependant, la faible teneur en cytidine déaminase des MDSC ne leur permet pas d'expulser toute la Gem qui peut alors agir sur l'ADN et bloquer sa synthèse.

La population de MDSC est presque entièrement éradiquée cinq jours après le traitement mais il aurait été intéressant de regarder leur évolution à des temps plus tardifs ainsi que de regarder si d'autres populations de cellules myéloïdes se développent en l'absence des MDSC.

Les dommages sur l'ADN dus aux traitements par 5-FU et Gem activent des protéines BH3 qui bloquent l'inhibiteur de Bax, Bcl2 (Tait and Green, 2010). Bax perméabilise ensuite le lysosome permettant l'entrée des protéines lysosomales dans le cytoplasme. Certaines protéases lysosomales, comme les cathepsines B et D restent actives au pH neutre retrouvé dans le cytoplasme. Les ROS sont également capables de perméabiliser le lysosome et donc de libérer les

cathepsines dans le cytoplasme (Kroemer and Jaattela, 2005). La perméabilisation du lysosome et la libération de son contenu pourrait constituer le lien entre les différentes voies d'activation de l'inflammasome NLRP3.

La cathepsine B, qui est une protéase, est capable d'interagir avec la protéine NLRP3. Sa fonction de protéase a longtemps fait penser qu'un clivage de NLRP3 était nécessaire à son activation mais aucun clivage de NLRP3 n'a été observé lors de son interaction avec la cathepsine B. Cependant l'interaction entre ces deux protéines est peut être responsable d'un changement dans la conformation 3D de NLRP3, qui permet alors l'activation de l'inflammasome. L'interaction avec la cathepsine B a lieu au niveau du domaine LRR de NLRP3, ce qui n'est pas surprenant car ce domaine est responsable de la détection des ligands pour de nombreux autres PRR, comme la famille des TLR (Brown et al., 2011).

Les traitements par 5-FU ou par Gem provoquent une production d'IL-1 $\beta$  par les MDSC puis une mort de ces cellules par apoptose. Nous n'avons pas réussi à dissocier ces deux phénomènes malgré l'utilisation de doses très faibles de chimiothérapie. Il semble qu'au moins une partie des événements responsables de l'activation de l'inflammasome soient aussi responsables du déclenchement de l'apoptose. L'activation de Bax par les dommages sur l'ADN mène à la perméabilisation du lysosome mais également des mitochondries (Tait and Green, 2010). La perméabilisation de la membrane externe des mitochondries provoque l'entrée dans le cytoplasme des protéines contenues auparavant entre les deux membranes mitochondriales, comme le cytochrome c. Dans le cytoplasme, celui-ci se lie à APAF1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1) et induit la formation de l'apoptosome, conduisant à l'activation des caspases effectrices 3 et 7 et à l'apoptose de la cellule.

L'activation de la caspase-1 est observée à partir de 12h après traitement, ce délai, relativement long par rapport à ceux généralement observés (environ 6h) (Petrilli et al., 2007), s'explique par le besoin du 5-FU et de la Gem d'être métabolisés avant de pouvoir s'intégrer à l'ADN et bloquer sa synthèse.

L'IL-1 $\beta$  produite par les MDSC après un traitement par 5-FU ou par Gem agit sur les autres cellules du système immunitaire. Ses actions sont fonction de sa quantité et de la durée de sa production. Il est connu qu'une forte dose d'IL-1 $\beta$  produite en un court laps de temps, mimant ainsi une inflammation aigue, a un effet sur les lymphocytes T CD8. Une grande quantité d'IL-1 $\beta$  augmente la

production d'IFN- $\gamma$  par ces lymphocytes T CD8 (Ghiringhelli et al., 2009) et les active. Une faible quantité d'IL-1 $\beta$  produite pendant une longue durée (quelques jours), qui correspond à ce qui est observé lors d'une inflammation chronique, a un effet sur les lymphocytes T CD4 Th17. Ainsi *in vitro*, une faible dose d'IL-1 $\beta$ , comme retrouvée dans notre système, présente pendant plusieurs jours est responsable d'une augmentation dans la quantité d'IL-17 produite par les Th17, comme observé dans ce travail. Le 5-FU et la Gem ne favorisent donc pas la mise en place d'une immunité anti-tumorale efficace, malgré l'élimination des MDSC, mais participent au développement d'une nouvelle immunosuppression via la production d'IL-1 $\beta$ .

L'IL-1 $\beta$  peut être secrétée par des cellules innées du système immunitaire mais aussi par des cellules cancéreuses. Elle est notamment responsable du développement des MDSC. De plus, elle peut initier et faciliter le développement de tumeurs comme l'ont montré différentes études de carcinogénèse induite (Krelin et al., 2007; Tu et al., 2008). Enfin, l'IL-1 $\beta$  favorise l'invasion des tissus sains par les métastases en augmentant l'angiogénèse (Saijo et al., 2002). Cependant, elle a également un rôle positif, entre autre sur les lymphocytes T CD8, qu'elle active et fait produire plus d'IFN- $\gamma$ , sur les lymphocytes B, dont la prolifération augmente en présence d'IL-1 $\beta$  (Sims and Smith, 2010) ou encore sur les lymphocytes Th17 qui, différenciés en présence d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-23, deviennent anti-tumoraux (Chalmin et al., 2012).

La production d'IL-1 $\beta$ , retrouvée après traitement par 5-FU ou Gem, provoque une augmentation de la quantité d'IL-17 produite, notamment dans les ganglions drainants la tumeur. Différentes cytokines provoquent la phosphorylation de STAT3 qui induit la transcription d'IL-17. Ces cytokines, dont l'IL-6, l'IL-21, l'IL-1 $\beta$  et IL-23 sont retrouvées dans le microenvironnement tumoral. Cette IL-17 favorise le développement de l'angiogénèse dans le cancer mais aussi dans la polyarthrite rhumatoïde (Berger et al., 2013; Pickens et al., 2010). Le mécanisme par lequel l'IL-17 augmente l'angiogénèse n'est néanmoins pas décrit à ce jour. Cependant, des études ont également observé un rôle anti-tumoral de l'IL-17, où celle-ci diminue la tumorigénèse, la croissance tumorale et la dispersion de métastases (Kryczek et al., 2009; Tong et al., 2012). Le rôle de l'IL-17, particulièrement dans le cancer, reste ambivalent et dépend probablement du microenvironnement cellulaire et cytokinique dans lequel elle se situe.



Une angiogénèse efficace est un événement critique pour le développement de la tumeur. Elle diminue l'hypoxie et la nécrose ayant lieu au centre de la tumeur et le développement de vaisseaux sanguins permet l'apport de nutriments et d'oxygène nécessaires aux cellules tumorales. De plus, ces vaisseaux permettent la dissémination des cellules cancéreuses et donc le développement de métastases dans d'autres organes (Claesson-Welsh and Welsh, 2013). Des molécules anti-angiogéniques (Avastin) sont par ailleurs déjà couramment utilisées dans divers traitements contre le cancer.

L'inflammation chronique est connue pour être un événement important dans la carcinogénèse et la croissance tumorale (Trinchieri, 2012). La production chronique d'IL-1 $\beta$  favorise le développement de cancer, ce qui met en avant l'importance de son contrôle dans la prévention contre le cancer ou dans les thérapies anticancéreuses. Il a été montré que l'IL-1 $\beta$  fait proliférer les MDSC et met en place une immunosuppression, particulièrement en cas de cancer (Bunt et al., 2007). De plus, dans un autre modèle, il a été montré que l'expression de NLRP3 dans le microenvironnement tumoral diminue l'immunité anti-tumorale et l'efficacité des vaccins en facilitant la migration des MDSC au site de la tumeur (van Deventer et al., 2010), proposant un autre effet négatif de NLRP3 dans le cancer.

Cet article montre un nouveau mécanisme de résistance à deux chimiothérapies, le 5-FU et la Gem, couramment utilisés dans les cancers colorectaux et du sein. Malgré leur élimination des MDSC, ces chimiothérapies provoquent l'activation de l'inflammasome NLRP3 par la cathepsine B. La production d'IL-1 $\beta$  qui en résulte augmente la production d'IL-17 qui va elle aider la mise en place d'une angiogénèse accrue et ainsi favoriser le développement de la tumeur (Figure 25).

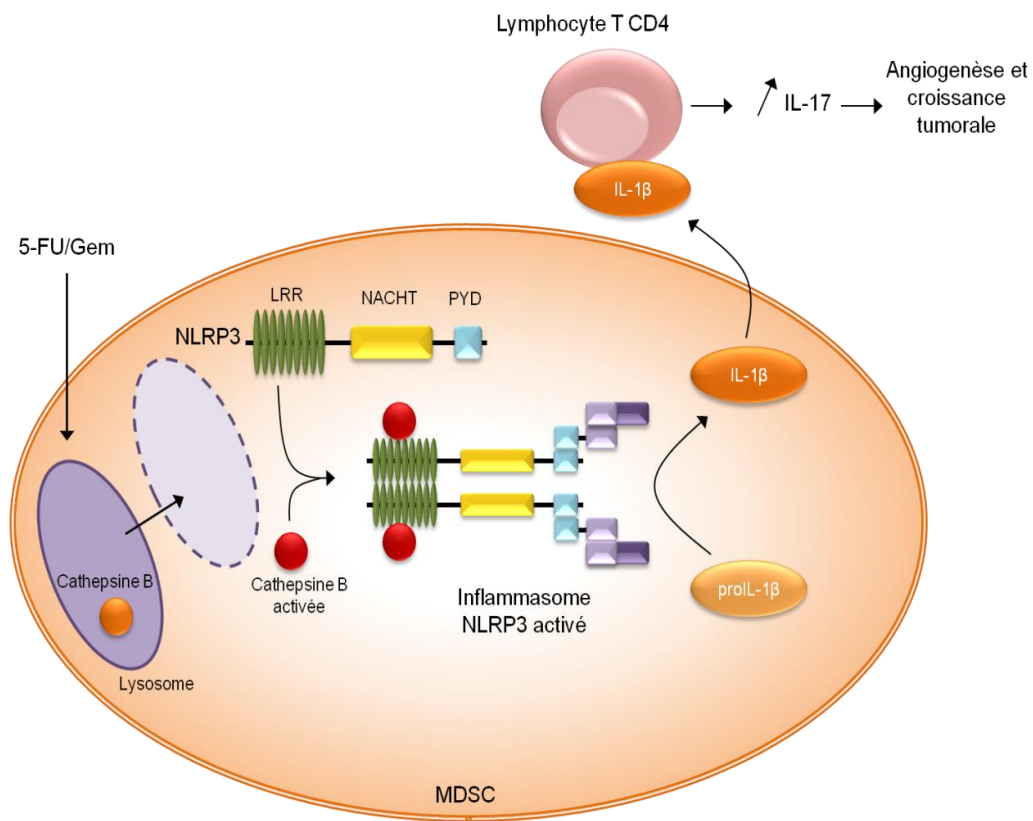


Figure 25 : Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC après traitement par 5-FU ou Gem.

Après un traitement par 5-FU ou par Gem, les lysosomes des MDSC se perméabilisent, permettant l'entrée dans le cytoplasme de la Cathepsine B. Celle-ci se lie au domaine LRR de NLRP3 et active l'inflammasome, provoquant la production d'IL-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  incite les lymphocytes T CD4 à produire plus d'IL-17 qui de façon indirecte augmente l'angiogenèse et donc la croissance tumorale.

Comme l'activation de la caspase-1 dans les MDSC et une augmentation de la quantité d'IL-1 $\beta$  et d'IL-17 ont été retrouvées dans le sang de patients atteints de cancers colorectaux métastatiques après traitement par 5-FU, ce travail suggère l'association d'inhibiteurs de NLRP3 ou d'IL-1 $\beta$  (comme l'anakinra, déjà utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde chez l'homme) avec les traitements anticancéreux existants afin d'en améliorer l'efficacité. En revanche, le 5-FU et la Gem sont presque toujours utilisés en association avec d'autres molécules dont les conséquences n'ont pas été étudiées sur l'augmentation de la production d'IL-17 ni sur l'angiogenèse.

## B. Rôle de NLRP3 dans la différenciation Th2

La seconde étude que j'ai menée concerne le rôle de NLRP3 dans la différenciation Th2. J'ai observé que la stimulation du TCR de lymphocytes T CD4 naïfs, résultait en l'augmentation de l'expression de NLRP3 dans ces cellules. Cette augmentation est dépendante du facteur de transcription STAT5 qui est activé par l'IL-2. Une fois activé, STAT5 se fixe sur le promoteur du gène codant pour NLRP3 et induit sa transcription. NLRP3 joue ensuite un rôle dans la polarisation Th2 où il se lie au facteur de transcription IRF4 et permet la transcription du gène codant pour l'IL-4, toujours en association avec IRF4.

La phosphorylation de STAT5 est observée dans tous les sous-types de T CD4 puisqu'elle fait suite à la signalisation par l'IL-2, qui est un événement précoce de la différenciation des lymphocytes T CD4. Plusieurs études ont montré le rôle de STAT5 dans la différenciation Th2 sans pour autant l'expliquer (Shatynski et al., 2012; Zhu et al., 2003). Ici, STAT5 se lie au promoteur de NLRP3 et induit sa transcription et sa diminution, effectuée grâce à l'utilisation de ShRNA, provoque une absence de la transcription de NLRP3. Aucun autre NLR, à l'exception de NLRP6 et NLRP12, n'est induit après stimulation du TCR de lymphocytes T CD4 naïfs.

130

---

Il est généralement admis que NLRP3 n'est pas exprimé dans les cellules du système immunitaire adaptatif mais restreint aux cellules du système immunitaire inné, principalement les cellules myéloïdes telles que les monocytes, les macrophages, les neutrophiles ou encore les cellules dendritiques (Guarda et al., 2011). Peu d'études relatent l'expression de NLRP3 dans les lymphocytes (Sutterwala et al., 2006). Cependant, traditionnellement, l'expression de NLRP3 est étudiée au niveau basal ou après stimulation par des activateurs connus de l'inflammasome NLRP3 comme le LPS et l'ATP ou encore les cristaux, d'acide urique ou d'alum (Martinon et al., 2006). Or dans notre système, aucun de ces activateurs n'entre en jeu, ce qui explique probablement en partie pourquoi NLRP3 n'a été que peu observé dans les lymphocytes.

Aucune activité de l'inflammasome NLRP3 n'est détectée dans les Th2, il n'y a ni caspase-1 active ni production d'IL-1 $\beta$  même si les composants de l'inflammasome NLRP3, la protéine adaptatrice ASC et la caspase-1, sont présents dans les Th2. Il est intéressant de noter que seul NLRP3 est induit après stimulation du TCR et que ASC et la caspase-1 sont déjà exprimés dans

les lymphocytes T naïfs. De plus, l'absence de ASC ou de la caspase-1 n'affecte pas la différenciation Th2 alors que l'absence de NLRP3 diminue grandement la quantité d'IL-4 produite *in vitro*. Ces données semblent indiquer un rôle de NLRP3 indépendant de l'inflammasome qu'il peut former.

L'inflammasome NLRP3 se situant dans le cytoplasme des cellules, la protéine NLRP3 a toujours été détectée dans ce compartiment cellulaire. Dans les lymphocytes Th2 cependant, des expériences d'immunofluorescence ont permis d'observer la présence de NLRP3 dans le cytoplasme mais également et pour la première fois, dans le noyau des cellules. Cette localisation cellulaire laisse penser que NLRP3 pourrait avoir une action sur l'ADN.

IRF4 est un facteur de transcription connu pour agir sur le promoteur du gène codant pour l'IL-4 (Ahyi et al., 2009; Rengarajan et al., 2002). Diverses expériences ont permis de mettre en évidence l'interaction de NLRP3 avec IRF4 ce qui renforce la possibilité d'un rôle de NLRP3 sur l'ADN. De plus, des immuno-précipitations de chromatines ont montré que NLRP3 et IRF4 se lient sur un des sites de fixation d'IRF4 sur le promoteur de l'IL-4 et que l'absence d'une des deux protéines empêche l'autre de se fixer. NLRP3, en association avec IRF4 agit donc comme un facteur de transcription dans les Th2. NLRP3 n'est pas le premier membre de la famille des NLR à avoir un rôle de facteur de transcription, CIITA et NLRC5 sont tous les deux connus pour leurs rôles dans la transcription des molécules de CMH II et CMH I respectivement (Cycon et al., 2013; Kobayashi and van den Elsen, 2012). IRF4 a également récemment été montré comme interagissant directement avec CIITA (Pan et al., 2013) en plus de NLRP3. Il serait alors intéressant de tester l'interaction d'IRF4 avec d'autres NLR dans différentes conditions et types cellulaires.

NLRP3 est induit dans tous les sous-types de lymphocytes T CD4, son expression étant reliée à la signalisation provoquée par l'IL-2 et menant à l'activation de STAT5. IRF4 est impliqué dans la différenciation d'autres sous-types de lymphocytes T dont les Th9. Il serait intéressant d'étudier l'impact de NLRP3 et la liaison NLRP3/IRF4 dans ces populations. De plus, les IRF étant des protéines clés dans la différenciation lymphocytaire T, l'étude de la liaison de ces différents IRF avec NLRP3 pourrait apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de la différenciation T CD4.

*In vivo*, dans des souris déficientes pour NLRP3, des Th2 sont retrouvés mais la quantité d'IL-4 produite est plus faible que dans des souris WT. D'autres types

cellulaires, comme les mastocytes, les basophiles (Maier, Duschl, and Horejs-Hoeck, 2012) ou les Tfh (King and Mohrs, 2009) sont capables de produire de l'IL-4 et STAT6 est connu pour son rôle comme facteur de transcription pour le gène codant pour l'IL-4 (Maier, Duschl, and Horejs-Hoeck, 2012). Dans les souris déficientes pour NLRP3, ces cellules sont peut être capables de produire de l'IL-4 via STAT6. Cette IL-4 servirait alors à initier la différenciation Th2 mais l'absence de production d'IL-4 par les Th2 eux même, et donc l'absence d'auto-amplification, empêcherait une différenciation complète de ces Th2.

Dans un modèle de mélanome et de cancer pulmonaire, la déficience en NLRP3 permet de freiner la croissance et le nombre des tumeurs. Cependant, il est impossible d'affirmer que cette différence avec les souris sauvages vient uniquement de la production d'IL-4 par les Th2. L'utilisation de souris déficientes pour NLRP3 spécifiquement dans les lymphocytes T CD4 permettrait de répondre à cette question.

Cet article décrypte un nouveau rôle de NLRP3, indépendant de l'inflammasome. NLRP3 est induit dans les lymphocytes T CD4 naïfs après stimulation de leur TCR. NLRP3 interagit ensuite avec IRF4 et se déplace dans le noyau où il agit en tant que facteur de transcription sur le promoteur du gène codant pour l'IL-4, en association avec IRF4. NLRP3 augmente la transcription du gène de l'IL-4 et son absence diminue drastiquement la quantité d'IL-4 produite (Figure 26).

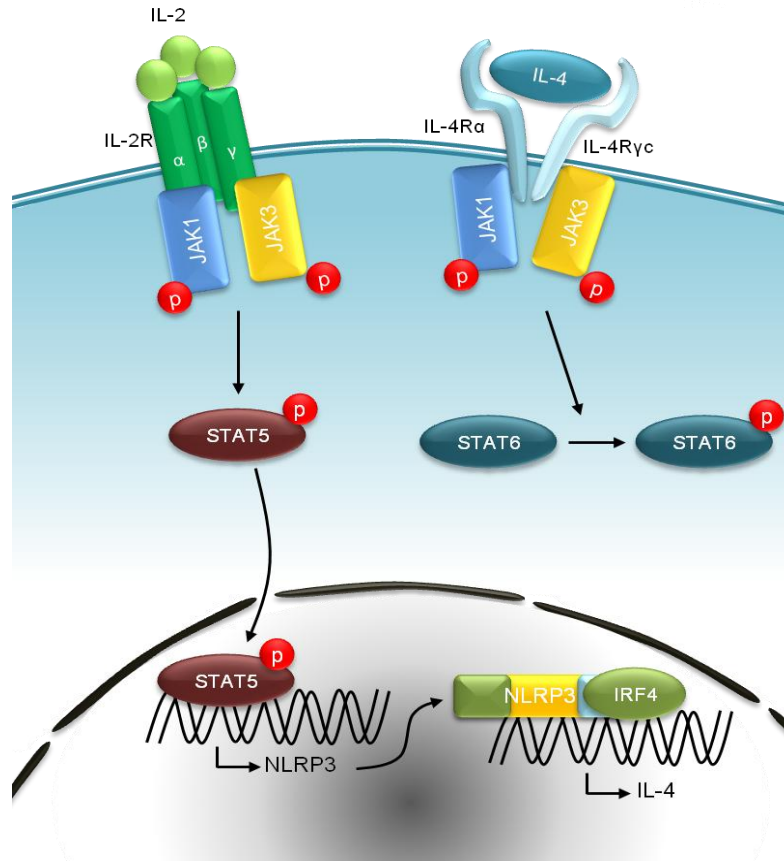


Figure 26 : Rôle de NLRP3 dans la différenciation Th2.

En se liant à son récepteur, l'IL-2 active la phosphorylation de STAT5 via JAK1 et JAK3. STAT5 phosphorylé migre dans le noyau où il active la transcription du gène codant pour NLRP3. Une fois produit, NLRP3 interagit avec IRF4 et active la transcription du gène de l'IL-4, permettant la mise en place d'une boucle d'auto-amplification des Th2.

Dans le cancer, la production d'IL-4 est délétère, en partie via son action sur les lymphocytes T CD8 naïfs. Ceux-ci expriment moins de CD8, sont moins cytotoxiques et ont une activité anti-tumorale moindre quand ils sont activés en présence d'IL-4 (Olver et al., 2013). L'IL-4 augmente également, *in vitro*, la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses comme des cellules de cancer du colon, du sein, des ovaires ou encore de la prostate (Hallett, Venmar, and Fingleton, 2012). De plus, l'IL-4 induit la différenciation des monocytes en macrophages de type M2, qui sont pro-tumoraux (De Palma, 2012). Dans l'asthme également, l'IL-4 est un facteur délétère majeur et la maîtrise de sa production permettrait de diminuer les symptômes de la maladie.

Ces données sur les effets délétères de l'IL-4 sont autant de raisons qui rationalisent le besoin de maîtriser sa production et l'utilisation d'inhibiteurs de NLRP3 pourrait au moins en partie résoudre ce problème.

## C. Discussion générale

NLRP3 est une protéine dont les fonctions sont loin de se limiter à l'inflammasome. Son rôle dans la formation de l'inflammasome a depuis longtemps été décrypté, mais de nombreuses équipes continuent à étudier l'implication de cet inflammasome NLRP3 dans de nombreuses maladies (Masters, 2013). La maîtrise de l'activation de l'inflammasome et des cytokines qu'il produit est un élément crucial, entre autre dans le cancer.

Le travail effectué ici montre qu'après traitement par certaines chimiothérapies, le 5-FU et la Gem, couramment utilisés chez l'homme dans le traitement du cancer du colon et du sein principalement, sont capables d'éliminer de façon spécifique une population immunosuppressive développée par les cellules cancéreuses, les MDSC. Si l'élimination d'une population immunosuppressive est un événement positif qui permet le retour d'une immunité anti-tumorale, marquée par une réduction de la taille de la tumeur, elle n'est pas sans conséquence. En effet, le 5-FU et la Gem déclenchent une cascade d'événements qui mène à l'activation de l'inflammasome NLRP3 via une interaction entre NLRP3 et la cathepsine B. L'activation de l'inflammasome a pour conséquence la production d'IL-1 $\beta$ .

134

---

Cette IL-1 $\beta$  agit ensuite sur le système immunitaire adaptatif et fait augmenter la quantité d'IL-17 produit par les lymphocytes T CD4, en particulier dans les ganglions drainants la tumeur. Cette IL-17 a pour effet d'augmenter l'angiogenèse. Ce phénomène a lieu quelques jours après la mort des MDSC et c'est pendant ce laps de temps, quand les MDSC sont éliminées mais que l'IL-17 n'a pas encore augmenté que l'immunité anti-tumorale est efficace.

Ce travail étudie NLRP3 dans son rôle traditionnel dans l'inflammasome et il met en avant l'importance de maîtriser son activation, ou du moins les produits de son activation (IL-1 $\beta$ ) dans certains traitements chimiothérapeutiques.

Le second travail concerne un tout nouveau rôle de NLRP3, celui de facteur de transcription dans la différenciation Th2. Dans les lymphocytes T CD4, NLRP3 est induit après activation du TCR et se lie à IRF4 pour aller activer la transcription du gène codant pour l'IL-4. NLRP3 effectue ce rôle de facteur de transcription indépendamment des autres protéines formant l'inflammasome

NLRP3 et il n'a pas besoin de stimuli comme l'ATP ou les cristaux d'acide urique pour être actif.

NLRP3 semble jouer un rôle majeur dans la transcription de l'IL-4 dans les Th2 et cette IL-4 possède de nombreux effets pro-tumoraux, que ce soit en activant la prolifération des cellules cancéreuses ou en transformant les monocytes en macrophages de type 2 par exemple. En l'absence de NLRP3, la quantité d'IL-4 produite diminue drastiquement et tous ses effets pro-tumoraux avec.

Une nouvelle fois, NLRP3 semble avoir un effet délétère dans le cancer. Le rôle de NLRP3 en dehors du complexe protéique qu'il forme avec l'inflammasome met en avant l'importance de pouvoir inhiber cette protéine et non simplement les produits de son activation comme l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-18. Le développement d'inhibiteurs spécifiques de NLRP3 est donc un enjeu majeur aujourd'hui dans le traitement du cancer.



# Conclusion et perspectives

Ce travail a permis d'explorer et de mieux comprendre les rôles et les effets de la protéine NLRP3, soit après chimiothérapie dans les MDSC soit dans le développement des lymphocytes Th2.

Dans la première étude, le traitement par deux chimiothérapies, le 5-FU et la Gem, de souris porteuses de tumeur ne suffisait pas à éliminer totalement la tumeur alors qu'il avait été découvert précédemment (Vincent et al., 2010) que ces deux chimiothérapies sont capables de restaurer une immunité anti-tumorale en éliminant une population immunosuppressive, les MDSC. Cependant, avant de disparaître par apoptose, ces MDSC produisent de l'IL-1 $\beta$  suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les chimiothérapies et c'est cette IL-1 $\beta$ , en développant un autre type d'immunosuppression, via l'IL-17, qui est responsable du manque d'efficacité de ces chimiothérapies. L'association d'un inhibiteur de l'IL-1 $\beta$ , un récepteur soluble à l'IL-1 qui capte l'IL-1 $\beta$  libre et l'empêche d'être active, avec les chimiothérapies utilisées dans cette étude permet d'améliorer grandement l'efficacité de ces traitements et même de guérir un certain nombre de souris.

Des données préliminaires, obtenues chez des patients atteints de cancer colorectaux métastasés avant et après traitements contenant du 5-FU, montrent que la cascade d'événements observée chez la souris se retrouve chez l'homme, au moins en ce qui concerne la production d'IL-1 $\beta$  par les MDSC et l'augmentation de l'IL-17 après traitement par 5-FU. Il existe chez l'homme un inhibiteur d'IL-1 $\beta$ , l'Anakinra, qui est couramment utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et tout laisse à penser que l'association de cet inhibiteur d'IL-1 $\beta$  avec le 5-FU ou la Gem pourrait augmenter l'efficacité de ces traitements. Une étude clinique a par ailleurs été mise en place au Centre de cancérologie Georges François Leclerc par François Ghiringhelli afin de tester cette association.

L'IL-18 est la grande oubliée de cette étude. Elle est produite par l'inflammasome, au même titre que l'IL-1 $\beta$ . Il serait intéressant de regarder ses effets sur le système immunitaire. En effet, la majorité des lymphocytes T CD4 possèdent le récepteur  $\alpha$  à l'IL-18 et l'IL-18 s'associe à l'IL-12 pour augmenter la production d'IFN- $\gamma$ . Cependant, de hautes concentrations d'IL-18 ont été associées avec des stades avancés de sept différents types de cancer (Lippitz, 2013). Ses effets pro- ou anti-tumoraux restent donc à déterminer.

La seconde étude est une première dans son genre. Elle décrypte l'action de NLRP3 dans la différenciation Th2, où NLRP3 se lie à IRF4 pour ensuite aller activer la transcription du gène codant pour l'IL-4, toujours en association avec IRF4. NLRP3 agit dans ce contexte de façon indépendante des autres protéines formant l'inflammasome, bien que celles-ci soient présentes dans la cellule au même moment.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives, NLRP3 étant induit dans les lymphocytes T CD4 naïfs par la signalisation de l'IL-2, il est présent dans tous les sous-types de T helper au moins à un stade précoce de la différenciation. Il serait alors intéressant de regarder son rôle dans les autres sous-types de T helper. De plus, NLRP3 s'associe avec IRF4 pour effectuer son action de facteur de transcription et les différents IRF sont importants dans la différenciation T mais aussi dans les cellules innées du système immunitaires. Il serait donc intéressant d'étudier l'association de NLRP3 avec différents IRF dans les lymphocytes T helper mais également dans les macrophages ou dans les cellules dendritiques (Tamura et al., 2008) où ils servent à la transcription de cytokines pro-inflammatoires.

La signalisation de l'IL-2 augmente également l'expression de deux autres NLR, NLRP6 et NLRP12 et l'action de ces NLRP sur la différenciation T CD4 n'a pas été abordée. Ces NLRP ont peut être, au même titre que NLRP3, des effets sur la différenciation ou sur l'expression de cytokines, que ce soit dans le cytoplasme ou dans le noyau.

D'un point de vue thérapeutique, cette découverte donne un nouvel angle d'accès à la maîtrise de la production de l'IL-4 et appuie encore l'importance du développement d'inhibiteurs de NLRP3. De nombreux laboratoires de recherche sont aujourd'hui associés à des laboratoires pharmaceutiques et mettent tout en œuvre pour découvrir et mettre en place un inhibiteur de NLRP3. Cet inhibiteur aura, à mon sens, une place importante dans les thérapeutiques qui seront mises en place dans les années à venir après sa découverte, NLRP3 étant une cible thérapeutique de choix dans de nombreuses maladies.

Malgré les nombreuses études menées sur NLRP3, cette protéine semble posséder de nombreuses fonctions encore inexplorées. Une étude moins dogmatique de NLRP3, en dehors de l'inflammasome et des cellules myéloïdes, pourrait probablement mener à d'autres découvertes. Cette conclusion est

généralisable à de nombreux autres NLR dont l'étude est trop souvent limitée à leurs rôles déjà connus.

# Bibliographie

- Abulafia, D. P., de Rivero Vaccari, J. P., Lozano, J. D., Lotocki, G., Keane, R. W., and Dietrich, W. D. (2009). Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**(3), 534-44.
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**(3), 319-25.
- Ahyi, A. N., Chang, H. C., Dent, A. L., Nutt, S. L., and Kaplan, M. H. (2009). IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines. *J Immunol* **183**(3), 1598-606.
- Akdis, C. A., and Blaser, K. (2003). Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **112**(1), 15-22.
- Albert, M. L., Jegathesan, M., and Darnell, R. B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* **2**(11), 1010-7.
- Ancrile, B., Lim, K. H., and Counter, C. M. (2007). Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev* **21**(14), 1714-9.
- Arthur, J. C., Lich, J. D., Ye, Z., Allen, I. C., Gris, D., Wilson, J. E., Schneider, M., Roney, K. E., O'Connor, B. P., Moore, C. B., Morrison, A., Sutterwala, F. S., Bertin, J., Koller, B. H., Liu, Z., and Ting, J. P. (2010). Cutting edge: NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity. *J Immunol* **185**(8), 4515-9.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **190**(7), 995-1004.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay Nel, H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W. H., Brasnu, D. F., and Tartour, E. (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* **12**(2), 465-72.
- Barthlott, T., Moncrieffe, H., Veldhoen, M., Atkins, C. J., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. (2005). CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol* **17**(3), 279-88.
- Bauer, C., Duewell, P., Mayer, C., Lehr, H. A., Fitzgerald, K. A., Dauer, M., Tschopp, J., Endres, S., Latz, E., and Schnurr, M. (2010). Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* **59**(9), 1192-9.
- Baumjohann, D., Kageyama, R., Clingan, J. M., Morar, M. M., Patel, S., de Kouchkovsky, D., Bannard, O., Bluestone, J. A., Matloubian, M., Ansel, K. M., and Jeker, L. T. (2013). The microRNA cluster miR-17 approximately 92 promotes TFH cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression. *Nat Immunol* **14**(8), 840-8.
- 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**(6), 2114-21.
- Berger, H., Vegran, F., Chikh, M., Gilardi, F., Ladoire, S., Bugaut, H., Mignot, G., Chalmin, F., Bruchard, M., Derangere, V., Chevriaux, A., Rebe, C., Ryffel, B., Pot, C., Hichami, A., Desvergne, B., Ghiringhelli, F., and Apetoh, L. (2013). SOCS3 Transactivation by PPARgamma Prevents IL-17-Driven Cancer Growth. *Cancer Res* **73**(12), 3578-3590.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* **6**(8), 611-22.

- Boehm, T. (2011). Design principles of adaptive immune systems. *Nat Rev Immunol* **11**(5), 307-17.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**, 749-95.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**(50), 6434-51.
- Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N., and Martin, M. (2011). TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res* **90**(4), 417-27.
- Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Vegran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J. L., Kanellopoulos, J., Martin, F., Rebe, C., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med* **19**(1), 57-64.
- Bulua, A. C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K. Y., Sack, M. N., Kastner, D. L., and Siegel, R. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* **208**(3), 519-33.
- Bunt, S. K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* **67**(20), 10019-26.
- Byrne, S. N., Knox, M. C., and Halliday, G. M. (2008). TGFbeta is responsible for skin tumour infiltration by macrophages enabling the tumours to escape immune destruction. *Immunol Cell Biol* **86**(1), 92-7.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Fox, B. C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., Montserrat, E., Campo, E., and Banham, A. H. (2006). High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* **108**(9), 2957-64.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(9), 3666-70.
- Casey, K. A., and Mescher, M. F. (2007). IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. *J Immunol* **178**(12), 7640-8.
- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J. P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., De Thonel, A., Multhoff, G., Hamman, A., Martin, F., Chauffert, B., Solary, E., Zitvogel, L., Garrido, C., Ryffel, B., Borg, C., Apetoh, L., Rebe, C., and Ghiringhelli, F. (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**(2), 457-71.
- Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Vegran, F., Hichami, A., Ladoire, S., Derangere, V., Vincent, J., Masson, D., Robson, S. C., Eberl, G., Pallandre, J. R., Borg, C., Ryffel, B., Apetoh, L., Rebe, C., and Ghiringhelli, F. (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* **36**(3), 362-73.
- Chen, G. Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., and Nunez, G. (2011). A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J Immunol* **186**(12), 7187-94.

- Chen, J., and Liu, X. (2009). The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications. *Cell Immunol* **254**(2), 85-90.
- Cheng, P., Corzo, C. A., Luetteke, N., Yu, B., Nagaraj, S., Bui, M. M., Ortiz, M., Nacken, W., Sorg, C., Vogl, T., Roth, J., and Gabrilovich, D. I. (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* **205**(10), 2235-49.
- Choi, Y. S., Yang, J. A., and Crotty, S. (2013). Dynamic regulation of Bcl6 in follicular helper CD4 T (T<sub>fh</sub>) cells. *Curr Opin Immunol* **25**(3), 366-72.
- Claesson-Welsh, L., and Welsh, M. (2013). VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med* **273**(2), 114-27.
- 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., Murray, P. J., and Vignali, D. A. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol* **13**(3), 290-9.
- 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**(7169), 566-9.
- Connolly, E. C., and Akhurst, R. J. (2011). The complexities of TGF-beta action during mammary and squamous cell carcinogenesis. *Curr Pharm Biotechnol* **12**(12), 2138-49.
- Conti, B. J., Davis, B. K., Zhang, J., O'Connor, W., Jr., Williams, K. L., and Ting, J. P. (2005). CATERPILLER 16.2 (CLR16.2), a novel NBD/LRR family member that negatively regulates T cell function. *J Biol Chem* **280**(18), 18375-85.
- Costinean, S., Zanasi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C. M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18), 7024-9.
- 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**(6), 3199-208.
- Cui, J., Li, Y., Zhu, L., Liu, D., Songyang, Z., Wang, H. Y., and Wang, R. F. (2012). NLRP4 negatively regulates type I interferon signaling by targeting the kinase TBK1 for degradation via the ubiquitin ligase DTX4. *Nat Immunol* **13**(4), 387-95.
- Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D., and Mescher, M. F. (2005). Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* **174**(8), 4465-9.
- Cycon, K. A., Mulvaney, K., Rimsza, L. M., Persky, D., and Murphy, S. P. (2013). Histone deacetylase inhibitors activate CIITA and major histocompatibility complex class II antigen expression in diffuse large B cell lymphoma. *Immunology*.
- Damm, A., Lautz, K., and Kufer, T. A. (2013). Roles of NLRP10 in innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* **15**(6-7), 516-23.
- Dang, E. V., Barbi, J., Yang, H. Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H. R., Luo, W., Zeller, K., Shimoda, L., Topalian, S. L., Semenza, G. L., Dang, C. V., Pardoll, D. M., and Pan, F. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **146**(5), 772-84.
- Dankbar, B., Padro, T., Leo, R., Feldmann, B., Kropff, M., Mesters, R. M., Serve, H., Berdel, W. E., and Kienast, J. (2000). Vascular endothelial growth



- factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* **95**(8), 2630-6.
- De Palma, M. (2012). Partners in crime: VEGF and IL-4 conscript tumour-promoting macrophages. *J Pathol* **227**(1), 4-7.
- Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A., and MacFarlane, M. (2012). The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res* **318**(11), 1269-77.
- Dietlin, T. A., Hofman, F. M., Lund, B. T., Gilmore, W., Stohlman, S. A., and van der Veen, R. C. (2007). Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. *J Leukoc Biol* **81**(5), 1205-12.
- Dilek, N., Vuillefroy de Silly, R., Blancho, G., and Vanhove, B. (2012). Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol* **3**, 208.
- 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**(2), 145-53.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**(5876), 674-7.
- Dugast, A. S., Haudebourg, T., Coulon, F., Heslan, M., Haspot, F., Poirier, N., Vuillefroy de Silly, R., Usal, C., Smit, H., Martinet, B., Thebault, P., Renaudin, K., and Vanhove, B. (2008). Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* **180**(12), 7898-906.
- Eljaafari, A., Farre, A., Duperrier, K., Even, J., Vie, H., Michallet, M., Souillet, G., Catherine Freidel, A., Gebuhrer, L., and Rigal, D. (2001). Generation of helper and cytotoxic CD4+T cell clones specific for the minor histocompatibility antigen H-Y, after in vitro priming of human T cells by HLA-identical monocyte-derived dendritic cells. *Transplantation* **71**(10), 1449-55.
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruvey, J. M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., and Reed, J. C. (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* **25**(5), 713-24.
- Feng, L. L., Gao, J. M., Li, P. P., and Wang, X. (2011). IL-9 contributes to immunosuppression mediated by regulatory T cells and mast cells in B-cell non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Immunol* **31**(6), 1084-94.
- Ferrara, N. (2010). Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(1), 21-6.
- Flavell, R. A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S. H., and Licona-Limon, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol* **10**(8), 554-67.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., and Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* **195**(3), 346-55.
- Geijtenbeek, T. B., and Gringhuis, S. I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**(7), 465-79.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J. L., Schlemmer, F., Tasdemir, E., Uhl, M., Genin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., Andre, F., Lidereau, R., McLaughlin, N. M., Haynes, N. M., Smyth, M. J., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-

- 1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* **15**(10), 1170-8.
- Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., Chauffert, B., Solary, E., Bonnotte, B., and Martin, F. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* **34**(2), 336-44.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P. E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., Lecesne, A., Robert, C., Blay, J. Y., Bernard, J., Caillat-Zucman, S., Freitas, A., Tursz, T., Wagner-Ballon, O., Capron, C., Vainchencker, W., Martin, F., and Zitvogel, L. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* **202**(8), 1075-85.
- 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**(3), 968-75.
- Goswami, R., and Kaplan, M. H. (2012). Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. *J Immunol* **189**(6), 3026-33.
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**(3), 285-96.
- Grimes, C. L., Ariyananda Lde, Z., Melnyk, J. E., and O'Shea, E. K. (2012). The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *J Am Chem Soc* **134**(33), 13535-7.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**(6), 883-99.
- Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., Veys, I., Haibe-Kains, B., Singhal, S. K., Michiels, S., Rothe, F., Salgado, R., Duvillier, H., Ignatiadis, M., Desmedt, C., Bron, D., Larsimont, D., Piccart, M., Sotiriou, C., and Willard-Gallo, K. (2013). CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest* **123**(7), 2873-92.
- Guarda, G., Zenger, M., Yazdi, A. S., Schroder, K., Ferrero, I., Menu, P., Tardivel, A., Mattmann, C., and Tschopp, J. (2011). Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol* **186**(4), 2529-34.
- Half, E. F., Diebolder, C. A., Versteeg, M., Schouten, A., Brondijk, T. H., and Huizinga, E. G. (2012). Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin. *J Biol Chem* **287**(46), 38460-72.
- Hallett, M. A., Venmar, K. T., and Fingleton, B. (2012). Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13. *Cancer Res* **72**(24), 6338-43.
- Hanabuchi, S., Koyanagi, M., Kawasaki, A., Shinohara, N., Matsuzawa, A., Nishimura, Y., Kobayashi, Y., Yonehara, S., Yagita, H., and Okumura, K. (1994). Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11), 4930-4.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**(3), 353-64.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5), 646-74.
- Hartman, Z. C., Yang, X. Y., Glass, O., Lei, G., Osada, T., Dave, S. S., Morse, M. A., Clay, T. M., and Lyerly, H. K. (2011). HER2 overexpression elicits

- a proinflammatory IL-6 autocrine signaling loop that is critical for tumorigenesis. *Cancer Res* **71**(13), 4380-91.
- Hestdal, K., Ruscetti, F. W., Ihle, J. N., Jacobsen, S. E., Dubois, C. M., Kopp, W. C., Longo, D. L., and Keller, J. R. (1991). Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* **147**(1), 22-8.
- Hofer, T., Krichevsky, O., and Altan-Bonnet, G. (2012). Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Front Immunol* **3**, 268.
- Hsu, L. C., Ali, S. R., McGillivray, S., Tseng, P. H., Mariathasan, S., Humke, E. W., Eckmann, L., Powell, J. J., Nizet, V., Dixit, V. M., and Karin, M. (2008). A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(22), 7803-8.
- Hu, X., and Ivashkiv, L. B. (2009). Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* **31**(4), 539-50.
- 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., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Booth, C. J., Cho, J. H., Ouyang, W., Abraham, C., and Flavell, R. A. (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* **491**(7423), 259-63.
- Huynh, M. L., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* **109**(1), 41-50.
- 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**(5708), 430-3.
- Itoh, K., and Hirohata, S. (1995). The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol* **154**(9), 4341-50.
- Jin, C., and Flavell, R. A. (2010). Inflammasome activation. The missing link: how the inflammasome senses oxidative stress. *Immunol Cell Biol* **88**(5), 510-2.
- Jounai, N., Kobiyama, K., Shiina, M., Ogata, K., Ishii, K. J., and Takeshita, F. (2011). NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with beclin1. *J Immunol* **186**(3), 1646-55.
- Jutel, M., and Akdis, C. A. (2008). T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chem Immunol Allergy* **94**, 158-77.
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., and Krysko, D. V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* **38**(2), 209-23.
- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* **188**(1), 21-8.
- Kalinski, P., Hilkens, C. M., Snijders, A., Snijdwint, F. G., and Kapsenberg, M. L. (1997). IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* **159**(1), 28-35.
- Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Miyagishi, M., Taira, K., Yamamoto, K., Miura, O., and Miyatake, S. (2004). GATA-3 suppresses IFN-gamma promoter activity independently of binding to cis-regulatory elements. *FEBS Lett* **570**(1-3), 63-8.
- Kaplan, M. H. (2013). Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev* **252**(1), 104-15.
- Kennedy, A. D., and DeLeo, F. R. (2009). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* **43**(1-3), 25-61.

- Kersse, K., Bertrand, M. J., Lamkanfi, M., and Vandenabeele, P. (2011). NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev* **22**(5-6), 257-76.
- Kim, S., Takahashi, H., Lin, W. W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J. L., and Karin, M. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**(7225), 102-6.
- King, I. L., and Mohrs, M. (2009). IL-4-producing CD4+ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J Exp Med* **206**(5), 1001-7.
- Klymkowsky, M. W., and Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* **174**(5), 1588-93.
- Kobayashi, K. S., and van den Elsen, P. J. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol* **12**(12), 813-20.
- Kofoed, E. M., and Vance, R. E. (2011). Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* **477**(7366), 592-5.
- Kono, H., and Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* **8**(4), 279-89.
- 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**(7152), 484-7.
- Krelin, Y., Voronov, E., Dotan, S., Elkabets, M., Reich, E., Fogel, M., Huszar, M., Iwakura, Y., Segal, S., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. (2007). Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res* **67**(3), 1062-71.
- Kroemer, G., and Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* **5**(11), 886-97.
- Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., and Zou, W. (2009). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* **114**(2), 357-9.
- Kummer, J. A., Broekhuizen, R., Everett, H., Agostini, L., Kuijk, L., Martinon, F., van Bruggen, R., and Tschopp, J. (2007). Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* **55**(5), 443-52.
- 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**(7), 909-18.
- 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**(1), 96-104.
- Leonard, W. J., and Spolski, R. (2005). Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* **5**(9), 688-98.
- 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**(26), 19127-39.

- 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**(21), 8687-94.
- Li, Z., Zhang, Y., and Sun, B. (2011). Current understanding of Th2 cell differentiation and function. *Protein Cell* **2**(8), 604-11.
- Lippitz, B. E. (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol* **14**(6), e218-28.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**(5), 330-8.
- Lu, B., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundback, P., Valdes-Ferrer, S. I., Olofsson, P. S., Kalb, T., Roth, J., Zou, Y., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., Ting, J. P., Wang, H., Andersson, U., Antoine, D. J., Chavan, S. S., Hotamisligil, G. S., and Tracey, K. J. (2012a). Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* **488**(7413), 670-4.
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., Yang, J., Qian, J., and Yi, Q. (2012b). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest* **122**(11), 4160-71.
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., and Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* **2012**, 925135.
- Ma, C. S., Deenick, E. K., Batten, M., and Tangye, S. G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* **209**(7), 1241-53.
- Ma, G., Pan, P. Y., Eisenstein, S., Divino, C. M., Lowell, C. A., Takai, T., and Chen, S. H. (2011). Paired immunoglobulin-like receptor-B regulates the suppressive function and fate of myeloid-derived suppressor cells. *Immunity* **34**(3), 385-95.
- Maier, E., Duschl, A., and Horejs-Hoeck, J. (2012). STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization. *Eur J Immunol* **42**(11), 2827-33.
- Mailliard, R. B., Alber, S. M., Shen, H., Watkins, S. C., Kirkwood, J. M., Herberman, R. B., and Kalinski, P. (2005). IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med* **202**(7), 941-53.
- Mandrizzato, S., Solito, S., Falisi, E., Francescato, S., Chiarion-Sileni, V., Mocellin, S., Zanon, A., Rossi, C. R., Nitti, D., Bronte, V., and Zanovello, P. (2009). IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol* **182**(10), 6562-8.
- Mantovani, A. (2010). Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med* **10**(4), 369-73.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* **454**(7203), 436-44.
- Marigo, I., Bosio, E., Solito, S., Mesa, C., Fernandez, A., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Bicchato, S., Falisi, E., Calabrese, F., Basso, G., Zanovello, P., Cozzi, E., Mandrizzato, S., and Bronte, V. (2010). Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* **32**(6), 790-802.
- Martin, F., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2012). Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity? *Trends Mol Med* **18**(12), 742-9.
- 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**(51), 35283-6.

- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**(7081), 237-41.
- Masters, S. L. (2013). Specific inflammasomes in complex diseases. *Clin Immunol* **147**(3), 223-8.
- 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**(12), 1390-7.
- 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**(12), 4778-91.
- Michallet, M. C., Rota, G., Maslowski, K., and Guarda, G. (2013). Innate receptors for adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol*.
- Minkiewicz, J., de Rivero Vaccari, J. P., and Keane, R. W. (2013). Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* **61**(7), 1113-21.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765.
- Movahedi, K., Williams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J. A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* **111**(8), 4233-44.
- Muranski, P., and Restifo, N. P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**(13), 2402-14.
- Nikiteas, N. I., Tzanakis, N., Gazouli, M., Rallis, G., Daniilidis, K., Theodoropoulos, G., Kostakis, A., and Peros, G. (2005). Serum IL-6, TNFalpha and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: prognostic implications. *World J Gastroenterol* **11**(11), 1639-43.
- Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. (2011). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(23), 9601-6.
- Nunez, S., Saez, J. J., Fernandez, D., Flores-Santibanez, F., Alvarez, K., Tejon, G., Ruiz, P., Maldonado, P., Hidalgo, Y., Manriquez, V., Bono, M. R., Roseblatt, M., and Sauma, D. (2012). Th17 cells contribute to anti-tumor immunity and promote the recruitment of th1 cells to the tumor. *Immunology*.
- O'Garra, A., and Vieira, P. (2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* **10**(8), 801-5.
- O'Neill, L. A., and Greene, C. (1998). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* **63**(6), 650-7.
- 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**(5), 1001-13.
- 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**(2), 187-96.
- Oppenheim, J. J., and Yang, D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* **17**(4), 359-65.

- 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.
- Pan, H., O'Brien, T. F., Wright, G., Yang, J., Shin, J., Wright, K. L., and Zhong, X. P. (2013). Critical role of the tumor suppressor tuberous sclerosis complex 1 in dendritic cell activation of CD4 T cells by promoting MHC class II expression via IRF4 and CIITA. *J Immunol* **191**(2), 699-707.
- 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. *Immunol Lett* **94**(1-2), 141-51.
- Paul, W. E., and Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* **10**(4), 225-35.
- Peng, H., Chang, B., Lu, C., Su, J., Wu, Y., Lv, P., Wang, Y., Liu, J., Zhang, B., Quan, F., Guo, Z., and Zhang, Y. (2012). Nlrp2, a maternal effect gene required for early embryonic development in the mouse. *PLoS One* **7**(1), e30344.
- Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* **14**(9), 1583-9.
- Phipps, J. C., Aronoff, D. M., Curtis, J. L., Goel, D., O'Brien, E., and Mancuso, P. (2010). Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **78**(3), 1214-20.
- Pickens, S. R., Volin, M. V., Mandelin, A. M., 2nd, Kolls, J. K., Pope, R. M., and Shahrara, S. (2010). IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **184**(6), 3233-41.
- Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* **131**(4), 959-71.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Galkovitch-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., and Ben-Neriah, Y. (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* **431**(7007), 461-6.
- Ponsuksili, S., Brunner, R. M., Goldammer, T., Kuhn, C., Walz, C., Chomdej, S., Tesfaye, D., Schellander, K., Wimmers, K., and Schwerin, M. (2006). Bovine NALP5, NALP8, and NALP9 genes: assignment to a QTL region and the expression in adult tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol Reprod* **74**(3), 577-84.
- Poschke, I., Mougiakakos, D., and Kiessling, R. (2011). Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol Immunother* **60**(8), 1161-71.
- Pu, Y. S., Hour, T. C., Chuang, S. E., Cheng, A. L., Lai, M. K., and Kuo, M. L. (2004). Interleukin-6 is responsible for drug resistance and anti-apoptotic effects in prostatic cancer cells. *Prostate* **60**(2), 120-9.
- Purwar, R., Schlappbach, C., Xiao, S., Kang, H. S., Elyaman, W., Jiang, X., Jetten, A. M., Khoury, S. J., Fuhlbrigge, R. C., Kuchroo, V. K., Clark, R. A., and Kupfer, T. S. (2012). Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med*.
- 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., Benveniste, E. N., and Cong, Y. (2009). TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J Immunol* **183**(1), 97-105.
- Quezada, S. A., Simpson, T. R., Peggs, K. S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P. A., Restifo, N. P., and Allison, J. P. (2010). Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic

- activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* **207**(3), 637-50.
- Rathinam, V. A., Vanaja, S. K., and Fitzgerald, K. A. (2012). Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* **13**(4), 333-2.
- Regateiro, F. S., Howie, D., Nolan, K. F., Agorogiannis, E. I., Greaves, D. R., Cobbold, S. P., and Waldmann, H. (2011). Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *Eur J Immunol* **41**(10), 2955-65.
- 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**(8), 1003-12.
- Rincon, M., and Irvin, C. G. (2012). Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci* **8**(9), 1281-90.
- Robson, R. L., McLoughlin, R. M., Witowski, J., Loetscher, P., Wilkinson, T. S., Jones, S. A., and Topley, N. (2001). Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *J Immunol* **167**(2), 1028-38.
- Rodriguez, P. C., Ernstoff, M. S., Hernandez, C., Atkins, M., Zabaleta, J., Sierra, R., and Ochoa, A. C. (2009). Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* **69**(4), 1553-60.
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* **212**, 28-50.
- Saijo, Y., Tanaka, M., Miki, M., Usui, K., Suzuki, T., Maemondo, M., Hong, X., Tazawa, R., Kikuchi, T., Matsushima, K., and Nukiwa, T. (2002). Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. *J Immunol* **169**(1), 469-75.
- Schetter, A. J., Heegaard, N. H., and Harris, C. C. (2010). Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* **31**(1), 37-49.
- Schmitt, C., Tonnelle, C., Dalloul, A., Chabannon, C., Debre, P., and Rebollo, A. (2002). Aiolos and Ikaros: regulators of lymphocyte development, homeostasis and lymphoproliferation. *Apoptosis* **7**(3), 277-84.
- Scholz, C. C., and Taylor, C. T. (2013). Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. *Curr Opin Pharmacol*.
- Schreiber, R. D., Old, L. J., and Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**(6024), 1565-70.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**(2), 163-89.
- Seliger, B., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2008). IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res* **101**, 249-76.
- Shatynski, K. E., Chen, H., Kwon, J., and Williams, M. S. (2012). Decreased STAT5 phosphorylation and GATA-3 expression in NOX2-deficient T cells: role in T helper development. *Eur J Immunol* **42**(12), 3202-11.
- Shaw, P. J., McDermott, M. F., and Kanneganti, T. D. (2011). Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med* **17**(2), 57-64.
- Shenoy, A. R., Wellington, D. A., Kumar, P., Kassa, H., Booth, C. J., Cresswell, P., and MacMicking, J. D. (2012). GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science* **336**(6080), 481-5.



- Sims, J. E., and Smith, D. E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* **10**(2), 89-102.
- Smith, S. E., Hoelzinger, D. B., Dominguez, A. L., Van Snick, J., and Lustgarten, J. (2011). Signals through 4-1BB inhibit T regulatory cells by blocking IL-9 production enhancing antitumor responses. *Cancer Immunol Immunother* **60**(12), 1775-87.
- Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R., and Yagita, H. (2003). Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* **18**(1), 1-6.
- Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., and Busslinger, M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* **17**(6), 781-93.
- Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* **6**(5), 447-58.
- Steimle, V., Otten, L. A., Zufferey, M., and Mach, B. (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* **75**(1), 135-46.
- Strioga, M., Pasukoniene, V., and Characiejus, D. (2011). CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology* **134**(1), 17-32.
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G. S., Grant, E. P., Bertin, J., Coyle, A. J., Galan, J. E., Askenase, P. W., and Flavell, R. A. (2006). Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* **24**(3), 317-27.
- Tait, S. W., and Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9), 621-32.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**(6), 805-20.
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., and Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**, 535-84.
- Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., Sastre-Garau, X., Couturier, J., Mosseri, V., Vives, V., Banchereau, J., Fridman, W. H., Wijdenes, J., Lebecque, S., and Sautes-Fridman, C. (1999). Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* **59**(15), 3698-704.
- Tartour, E., Pere, H., Maillere, B., Terme, M., Merillon, N., Taieb, J., Sandoval, F., Quintin-Colonna, F., Lacerda, K., Karadimou, A., Badoual, C., Tedgui, A., Fridman, W. H., and Oudard, S. (2011). Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev* **30**(1), 83-95.
- Tian, X., Pascal, G., and Monget, P. (2009). Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol Biol* **9**, 202.
- Tili, E., Michaille, J. J., Wernicke, D., Alder, H., Costinean, S., Volinia, S., and Croce, C. M. (2011). Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(12), 4908-13.
- 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**(4), 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. *Curr Opin Immunol* **24**(2), 207-12.
- Tran, E. H., Prince, E. N., and Owens, T. (2000). IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* **164**(5), 2759-68.
- Trinchieri, G. (2012). Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu Rev Immunol* **30**, 677-706.
- Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E. A., Rickman, B., Betz, K. S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J. G., and Wang, T. C. (2008). Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* **14**(5), 408-19.
- Ueno, H., Kiyosawa, K., and Kaniwa, N. (2007). Pharmacogenomics of gemcitabine: can genetic studies lead to tailor-made therapy? *Br J Cancer* **97**(2), 145-51.
- 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**(3), 415-28.
- van Deventer, H. W., Burgents, J. E., Wu, Q. P., Woodford, R. M., Brickey, W. J., Allen, I. C., McElvania-Tekippe, E., Serody, J. S., and Ting, J. P. (2010). The inflammasome component NLRP3 impairs antitumor vaccine by enhancing the accumulation of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* **70**(24), 10161-9.
- 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**(8), 3052-61.
- Vladimer, G. I., Marty-Roix, R., Ghosh, S., Weng, D., and Lien, E. (2013). Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Curr Opin Microbiol* **16**(1), 23-31.
- Vladimer, G. I., Weng, D., Paquette, S. W., Vanaja, S. K., Rathinam, V. A., Aune, M. H., Conlon, J. E., Burbage, J. J., Proulx, M. K., Liu, Q., Reed, G., Mecsas, J. C., Iwakura, Y., Bertin, J., Goguen, J. D., Fitzgerald, K. A., and Lien, E. (2012). The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity* **37**(1), 96-107.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* **123**(3191), 309-14.
- 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., Yang, Y., Floess, S., Huehn, J., Oh, S., Li, M. O., Niec, R. E., Rudensky, A. Y., Dustin, M. L., Littman, D. R., and Lafaille, J. J. (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**(10), 1723-42, S1.
- Westerveld, G. H., Korver, C. M., van Pelt, A. M., Leschot, N. J., van der Veen, F., Repping, S., and Lombardi, M. P. (2006). Mutations in the testis-specific NALP14 gene in men suffering from spermatogenic failure. *Hum Reprod* **21**(12), 3178-84.
- Whitmire, J. K., Tan, J. T., and Whitton, J. L. (2005). Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med* **201**(7), 1053-9.
- Xiao, T. S., and Ting, J. P. (2012). NLRX1 has a tail to tell. *Immunity* **36**(3), 311-2.

- 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., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M., and Dong, C. (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* **28**(1), 29-39.
- Yao, W., Tepper, R. S., and Kaplan, M. H. (2011). Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *J Allergy Clin Immunol* **128**(6), 1357-1360 e5.
- Young, J. D., Cohn, Z. A., and Podack, E. R. (1986). The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science* **233**(4760), 184-90.
- Zaidi, M. R., and Merlino, G. (2011). The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clin Cancer Res* **17**(19), 6118-24.
- Zaki, M. H., Boyd, K. L., Vogel, P., Kastan, M. B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T. D. (2010a). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* **32**(3), 379-91.
- Zaki, M. H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T. D. (2010b). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J Immunol* **185**(8), 4912-20.
- Zenaro, E., Donini, M., and Dusi, S. (2009). Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. *J Leukoc Biol* **86**(6), 1393-401.
- Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y. N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., and Shao, F. (2011). The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* **477**(7366), 596-600.
- Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W. E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* **19**(5), 739-48.
- Zhu, J., Jankovic, D., Grinberg, A., Guo, L., and Paul, W. E. (2006). Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48), 18214-9.
- Zhu, J., Nathan, C., Jin, W., Sim, D., Ashcroft, G. S., Wahl, S. M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wright, C. D., and Ding, A. (2002). Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* **111**(6), 867-78.

# Annexes

Annexe1: Article « 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. »



# Cancer Research

## 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity

Julie Vincent, Grégoire Mignot, Fanny Chalmin, et al.

*Cancer Res* 2010;70:3052-3061. Published OnlineFirst April 13, 2010.

<b>Updated version</b>	Access the most recent version of this article at: doi: <a href="https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3690">10.1158/0008-5472.CAN-09-3690</a>
<b>Supplementary Material</b>	Access the most recent supplemental material at: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/04/05/0008-5472.CAN-09-3690.DC1.html">http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/04/05/0008-5472.CAN-09-3690.DC1.html</a>

<b>Cited Articles</b>	This article cites by 39 articles, 22 of which you can access for free at: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/8/3052.full.html#ref-list-1">http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/8/3052.full.html#ref-list-1</a>
<b>Citing articles</b>	This article has been cited by 16 HighWire-hosted articles. Access the articles at: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/8/3052.full.html#related-urls">http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/8/3052.full.html#related-urls</a>

<b>E-mail alerts</b>	<a href="#">Sign up to receive free email-alerts</a> related to this article or journal.
<b>Reprints and Subscriptions</b>	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at <a href="mailto:pubs@aacr.org">pubs@aacr.org</a> .
<b>Permissions</b>	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at <a href="mailto:permissions@aacr.org">permissions@aacr.org</a> .

## 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity

Julie Vincent<sup>1,2</sup>, Grégoire Mignot<sup>1</sup>, Fanny Chalmin<sup>1,2</sup>, Sylvain Ladoire<sup>1,2,3</sup>,  
Mélanie Bruchard<sup>1,2</sup>, Angélique Chevriaux<sup>1,3</sup>, François Martin<sup>1</sup>,  
Lionel Apetoh<sup>4</sup>, Cédric Rébé<sup>1,3</sup>, and François Ghiringhelli<sup>1,2,3</sup>

### Abstract

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) accumulate in the spleen and tumor bed during tumor growth. They contribute to the immune tolerance of cancer notably by inhibiting the function of CD8 (+) T cells. Thus, their elimination may hamper tumor growth by enhancing antitumor T-cell functions. We have previously reported that some anticancer agents relied on T cell-dependent anticancer responses to achieve maximal efficacy. However, the effect of anticancer agents on MDSC has remained largely unexplored. In this study, we observed that gemcitabine and 5-fluorouracil (5FU) were selectively cytotoxic on MDSC. *In vivo*, the treatment of tumor-bearing mice with 5FU led to a major decrease in the number of MDSC in the spleens and tumor beds of animals whereas no significant effect on T cells, natural killer cells, dendritic cells, or B cells was noted. Interestingly, 5FU showed a stronger efficacy over gemcitabine to deplete MDSC and selectively induced MDSC apoptotic cell death *in vitro* and *in vivo*. The elimination of MDSC by 5FU increased IFN- $\gamma$  production by tumor-specific CD8(+) T cells infiltrating the tumor and promoted T cell-dependent antitumor responses *in vivo*. Altogether, these findings suggest that the antitumor effect of 5FU is mediated, at least in part, by its selective cytotoxic action on MDSC. *Cancer Res*; 70(8); 3052–61. ©2010 AACR.

### Introduction

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) have been identified as a population of immature myeloid cells with the ability to suppress T-cell activation in humans and mice (1–3). These cells accumulate in the blood, lymph nodes, bone marrow, and at tumor sites in many human cancers and animal tumor models, and inhibit both adaptive and innate immunity (4). They notably have the capacity to inhibit CD8<sup>+</sup> T cell antigen-specific reactivity by different mechanisms, mainly through their capacities to produce nitric oxide and radical oxygen species (5–7). MDSC are phenotypically characterized in mice by the expression of the cell surface antigens Ly-6C/G (both recog-

nized by the Gr-1 antibody) and CD11b (2). A human counterpart of MDSC was proposed to lie in the CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup> subset (8–11). Elimination of MDSC in mouse tumor models was shown to enhance antitumor responses, resulting in tumor regression. In this regard, strategies aimed at depleting MDSC *in vivo* using agents that target MDSC such as antibodies (12) or cytotoxic agents as gemcitabine have been shown to be the most promising (13–15). Gemcitabine is an antimetabolite chemotherapeutic agent implemented in the clinic since the 1990s and was previously reported to be capable of depleting MDSC in tumor-bearing mice (14).

We and others have previously reported that some anticancer agents, in addition to their direct cytotoxic effects on tumor cells, feature the ability to promote the activation of the immune system of the host, resulting in enhanced antitumor responses (16, 17). To investigate whether conventional anticancer agents were also able to affect the biology of MDSC, we designed an *in vivo* drug screening assay in which we tested the effect of anticancer agents on the proportion of MDSC within tumor-bearing mice. Our results show for the first time that 5FU was able to reduce the number of MDSC in tumor beds by triggering their apoptotic cell death. We also observed that 5FU-mediated MDSC depletion triggered an increase in IFN- $\gamma$  production by tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells infiltrating the tumor bed and promoted a T-dependent antitumor effect. These results suggest that, beyond its direct cytotoxic effect

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>INSERM Research Center 866, AVENIR Team; <sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Burgundy, <sup>3</sup>Anti-Cancer Center, Georges François Leclerc, Dijon, France; and <sup>4</sup>Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

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

J. Vincent and G. Mignot contributed equally to this work.

**Corresponding Author:** François Ghiringhelli, INSERM 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon 21000 France. Phone: 333-803-93353; Fax: 333-803-93434; E-mail: fghiringhelli@dijon.fnclcc.fr.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

©2010 American Association for Cancer Research.

on tumor cells, 5FU possesses immunogenic properties that rely on the *in vivo* elimination of MDSC.

## Materials and Methods

**Mice and cell lines.** EL4, a thymoma cell line syngeneic of C57BL/6, were obtained from the American Type Culture Collection. MSC-1 and MSC-2 are immortalized MDSC cell lines obtained from BALB/c Gr-1<sup>+</sup> splenocytes and were given by V. Bronte (University of Padua, Padua, Italy). All cells were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies) with 10% fetal bovine serum enriched with 0.4 mmol/L of sodium pyruvate, 4 mmol/L of HEPES, and antibiotics (penicillin, streptomycin, and amphotericin B). BALB/c, C57BL/6, and Nude mice were purchased from the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest St. Isle, France), and used at 6 to 10 wk of age. TLR4<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice were provided by Bernhard Ryffel (UMR 6218 CNRS, Orleans, France). Animals were all maintained according to Animal Experimental Ethics Committee Guidelines.

**Tumor model.** EL4 cells ( $2 \times 10^5/100 \mu\text{L}$  PBS) were s.c. injected into the flank of mice. Mice were treated when tumor surface was  $\sim 100 \text{ mm}^2$ . EL4 cancer cells were injected s.c. to C57BL/6 mice, nude mice, and TLR4<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice. Tumor surfaces were measured thrice a week.

**In vivo chemotherapeutic treatments.** For *in vivo* experiments, mice received a unique injection of cyclophosphamide at 80 mg/kg of body weight, paclitaxel (36 mg/kg), raltitrexed (100 mg/kg), gemcitabine (120 mg/kg), doxorubicin (5 mg/kg), 5FU (50 mg/kg), or oxaliplatin (5 mg/kg). All drugs were administered by i.p. injection, except for doxorubicin, which was injected i.v.

**Isolation of MDSC from spleens and tumors.** Spleens were mechanically dissociated and individual spleen cells obtained through a 70- $\mu\text{m}$  cellular sieve, then centrifuged, counted and washed once with PBS. To maximize the presence of MDSC, single-cell suspensions prepared from the spleen of tumor-bearing mice were purified by magnetic selection of MDSC, using Gr1-phycoerythrin-cyanine 7 staining followed by anti-phycoerythrin-cyanine 7 magnetic beads (Miltenyi Biotec). Tumors were cut with scalpels in millimetric fragments that were then mechanically dissociated and passed through a 70- $\mu\text{m}$  cellular sieve. Tumor cells were laid down on a leukocyte-separating cushion and centrifuged ( $1,000 \times g$ , 20 min). Floating cells were collected, centrifuged, counted, and washed once with PBS.

**Fluorescence-activated cell sorting analyses of Treg and MDSC.** Five days after treatment with 5FU, cyclophosphamide, gemcitabine, oxaliplatin, or doxorubicin, tumor-bearing mice were sacrificed. Tumors and spleens were harvested and single cell suspensions were prepared. MDSC were stained with antibodies anti-CD11b, Ly-6C, and Ly-6G for 20 min at 4°C. After one wash with cold PBS, they were analyzed by flow cytometry. Tregs were stained with anti-CD4, anti-CD25, and anti-CD3 monoclonal antibodies for 20 min at 4°C. After one wash with cold PBS, they were permeabilized according to the manufacturer's protocol (Fix/Perm eBioscience), and stained with an anti-Foxp3 antibody

(eBiosciences) for 20 min at 4°C. After one wash with cold PBS, cells were analyzed by flow cytometry.

**Flow cytometry analyses.** Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses were performed using phycoerythrin (PE) cyanine 7 (Cy7)-conjugated anti-Gr1, allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD11b, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-Ly6C, PE-conjugated anti-Ly6G, peridinin-chlorophyll-protein (PerCP)-conjugated anti-CD4, APC-conjugated anti-CD3, PE-Cy7-conjugated anti-CD25, Efluor 450-conjugated anti-Foxp3, FITC-conjugated Annexin V, 7-aminoactinomycin D (7-AAD), APC-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-CD11c, Alexa 700-conjugated anti-CMH2, PerCP-conjugated anti-CD8, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), or Alexa 488-conjugated immunized rabbit serum. All antibodies were purchased from BD PharMingen or eBioscience. FITC-Flica caspase-3/7 apoptosis detection kits were purchased from Immunochemistry Technologies. FACS analyses were performed on a LSRII (BD Biosciences) using FACSDiva software (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (TreeStar).

Single cell suspension from tumors and spleens were centrifuged and saturated with 200  $\mu\text{L}$  of PBS containing 2% mouse serum for 15 min at 4°C. After centrifugation, cells were stained for 20 min at 4°C with the following antibodies: CD11b, Ly-6C, and Ly-6G for MDSC; CD3, CD4, and B220 for lymphocytes; and CD11c, CD11b, CMH2, and CD8 for dendritic cells. All cells were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole or 7-AAD and analyzed by flow cytometry.

**Intracellular stainings.** For IFN $\gamma$  intracellular staining, spleens, tumors, and tumor-draining lymph nodes were harvested and dissociated as reported above, 5 d after treatment. When MDSC were reinfused, they were injected i.v. 2 d after treatment. Leukocytes were then cultured *in vitro* in three different conditions: in anti-CD3-coated wells (0.1  $\mu\text{g}/\text{well}$  of a 96-well tissue culture plate), in anti-CD3-coated wells with the addition of killed tumor cells (with a ratio of one killed tumor cell per two effectors), or in anti-CD3-coated wells with the addition of soluble anti-CD3 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), soluble anti-CD28 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and interleukin-2 (1,000 UI/mL; Proleukin, Chiron). Stimulation was maintained for 16 h, with brefeldin A (BD GolgiPlug) for the last 4 h. Cells were then harvested and stained for CD4, CD8, and intracellular IFN $\gamma$  using the manufacturer's recommendations.

**Apoptosis assays.** Purified MDSC were cultured for 24 h *in vitro* with varying doses of 5FU or gemcitabine. *In vivo*, tumor-bearing mice were treated with 5FU or gemcitabine. Tumors and spleens were harvested and dissociated as described previously and then stained as follows: (a) Annexin V/7-AAD: MDSC were washed twice with cold PBS and prepared according to the manufacturer's protocol (BD PharMingen). After staining for 15 min at room temperature with Annexin V and 7-AAD, cells were analyzed by flow cytometry; (b) Flica 3/7: cells were manipulated according to the manufacturer's protocol (ImmunoChemistry Technologies). Briefly, cells were cultured for 1 h in the presence of FAM-Flica after pretreatment with PBS or varying doses of 5FU. Cells were then washed and analyzed by flow cytometry in the presence of 7-AAD. In some experiments, cell death was measured using the phenazine methosulfate



(PMS)/3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay (Promega). In PMS/MTS experiments, cells were treated for 1 h with 5FU at varying concentrations in round-bottomed 96-well plates. PMS/MTS was added after 48 h and the plates were read at 540 nm.

**Detection of calreticulin expression on tumor cells.** EL4 cancer cells were cultured for 24 h in complete culture medium supplemented or not with doxorubicin, gemcitabine, or 5FU. Cells were stained as described elsewhere (18). Briefly, cells were saturated with 200  $\mu$ L of PBS supplemented with 2% rabbit serum before being stained with a rabbit anti-calreticulin antibody for 20 min at 4°C. Cells were permeabilized or not with BD PharMingen, cells were incubated with anti-calreticulin rabbit antibody (AbCam) for 20 min at 4°C. Cells were then analyzed by flow cytometry.

**Thymidilate synthase expression.** Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). One hundred to 300 ng of RNA was reverse-transcribed into cDNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, random primers, and recombinant RNasin ribonuclease inhibitor (Promega). cDNA were quantified by real-time PCR using a SYBR Green Real-time PCR kit on a 7500 Fast detection system (Applied Biosystems). Relative mRNA levels were determined using the  $\Delta$ Ct method. Values were expressed relative to mouse cyclophilin A. The same results were obtained when normalized with mouse L32 and mouse hypoxanthine phosphoribosyltransferase (data not shown). The sequences of the oligonucleotides used in this study were as follows: mouse cyclophilin A (forward, 5'-GGCCGATGACGAGCCC-3'; reverse, 5'-TGTCTTTGGAACCTTGTCTGCAA-3') and mouse thymidilate synthase (TS; forward, 5'-caatggatcccagatatttc-3'; reverse, 5'-gtcatcagggtgtgttga-3').

**Statistical analysis.** Tests used were Student's *t* test or Mann-Whitney test for parametric and nonparametric means comparison. All tests were performed with GraphPad Prism software.

## Results

**5FU selectively depletes MDSC.** We tested the capacity of several cytotoxic agents used in conventional cancer chemotherapy to deplete MDSC *in vivo*. To this end, we used cyclophosphamide (an alkylating agent), doxorubicin (a topoisomerase II inhibitor), oxaliplatin (a platinum compound promoting DNA adducts), paclitaxel (a tubulin poison), gemcitabine (a deoxycytidine analogue that inhibits ribonucleotide reductase), and 5FU and raltitrexed [two antimetabolite agents that target thymidilate synthase (TS)]. These drugs were injected once in mice bearing 100 mm<sup>2</sup> EL4 thymoma subcutaneous tumors. In our model, MDSC were found to be abundant within the spleens and tumor beds of tumor-bearing mice before chemotherapeutic treatment (Fig. 1A), as previously described (19). Five days after injection of the cytotoxic agent, we observed that only gemcitabine and 5FU were able to significantly decrease the number of MDSC in both the spleen and tumor bed (Fig. 1A; see Supplementary

Fig. S1). Interestingly, 5FU had a more drastic effect than gemcitabine in decreasing MDSC frequency in tumor-bearing hosts. It is noteworthy that 5FU did not alter the frequency of the other cell populations within the spleen, except for a non-significant tendency for B cells to increase, compensating the loss of MDSC (Fig. 1B).

MDSC have been described to encompass at least two cell populations: granulocytic cells, Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup>, and monocytic cells, Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (9, 10). We did not find any preferential action from either 5FU or gemcitabine on any MDSC subtype. Indeed, both drugs were similarly effective against granulocytic and monocytic MDSC (Fig. 1C). We also monitored the duration of MDSC depletion induced by 5FU, and found that the nadir was around day 5 posttreatment, then MDSC number increased following tumor growth (Fig. 1D).

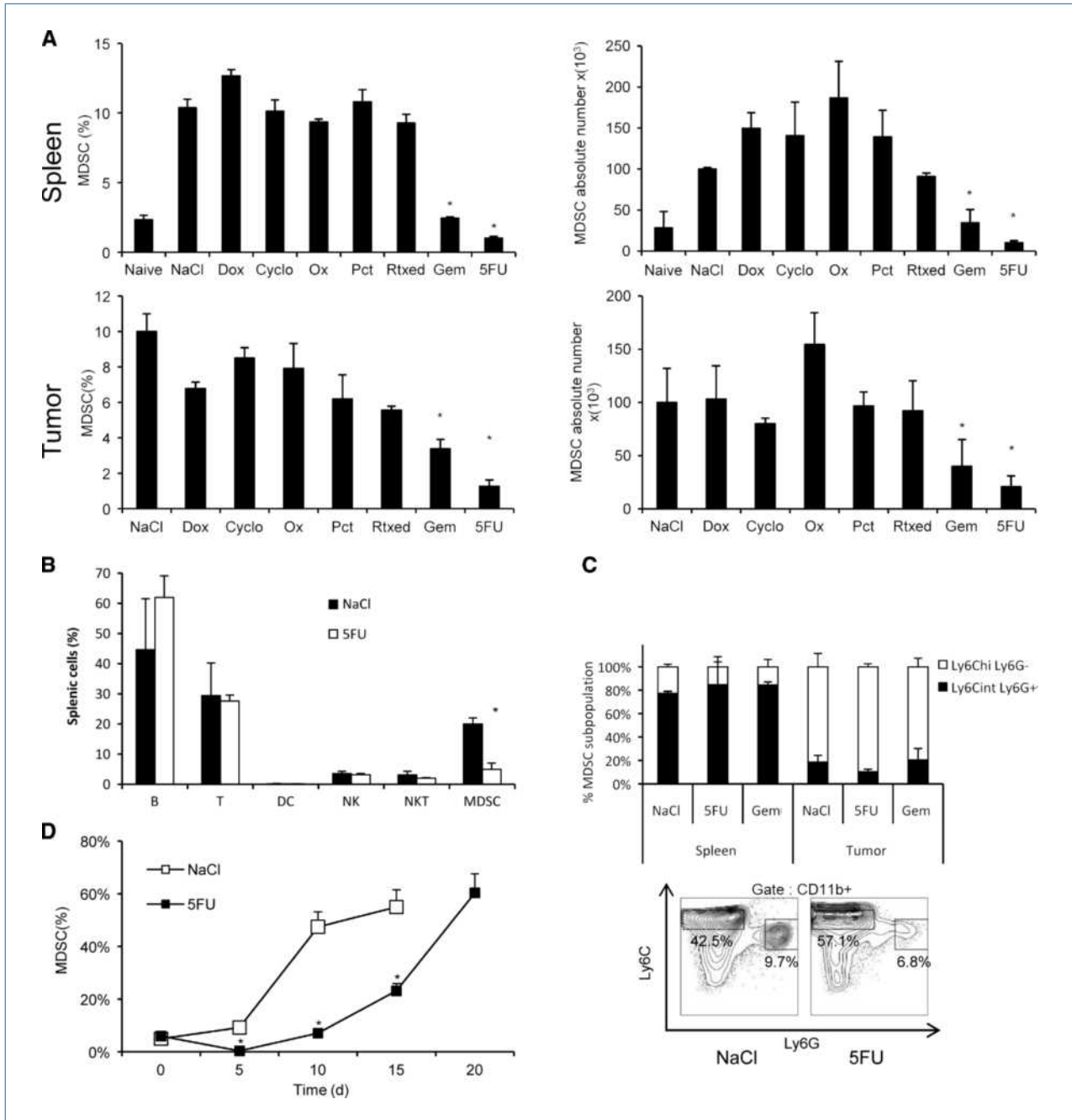
Thus, we show that, among the seven cytotoxic agents assayed, only 5FU (and to a lesser extent gemcitabine) was able to lower MDSC number within the tumor bed and spleen of cancer-bearing hosts.

**5FU triggers MDSC apoptosis.** The disappearance of MDSC from tumors and spleens could possibly be explained by the direct cytotoxic effect of 5FU, which could preferentially trigger their death. We therefore tested whether MDSCs were undergoing apoptosis after 5FU treatment.

Because of spontaneous rapid death of *ex vivo* MDSC, we took advantage of immortalized MDSC cell lines (20). First, we cultured established murine MDSC cell lines in the presence of various concentrations of 5FU and evaluated MDSC cell death using both Annexin V/7-AAD labeling (Fig. 2A, left) and the detection of activated caspases-3 and -7 (Fig. 2A, right). Both methods showed that 5FU triggered MDSC apoptotic cell death in a dose-dependent manner. *In vivo*, we could also note an increase in the presence of activated caspases-3 and -7 in splenic MDSC from 5FU-treated tumor-bearing mice compared with untreated mice, although other immune cells were not killed by 5FU at this dose (data not shown). To our surprise, we also noted that 5FU *in vitro* at low concentrations was more toxic in MSC cell lines than in tumor cells. Indeed, a 20-fold to 50-fold higher concentration of 5FU was required to kill EL4 tumor cells relative to MSC (Fig. 2B). Of note, freshly sorted MDSC underwent spontaneous and rapid death, but surviving cells were also 5FU-sensitive (data not shown).

The cytotoxic action of 5FU was mediated by its metabolites which inhibit TS. Low expression of TS has been shown to be involved in 5FU sensitivity in tumor cells (21–23); therefore, we hypothesized that MDSC's sensitivity to 5FU might be related to lower TS expression. We then performed quantitative PCR on cell extracts to test TS expression (Fig. 2C). We found that MDSC and MSC cell lines expressed fewer TS than splenocytes or tumor cells, thus suggesting that MDSC sensitivity to 5FU may be linked to their low expression of TS. On the whole, these results show that *in vitro* and *in vivo* low concentrations of 5FU selectively induced MDSC apoptotic cell death.

**5FU immunogenic effects are primarily attributable to MDSC depletion.** Chemotherapeutic agents have been shown to alter the antitumor response (16). Specifically,



**Figure 1.** 5FU and gemcitabine eliminate MDSC *in vivo*. A, mice were tumor-free (Naive) or inoculated s.c. with EL4 tumor cells. Five days after the indicated chemotherapy (NaCl, control mice; Dox, doxorubicin; CTX, cyclophosphamide; Ox, oxaliplatin; Pct, paclitaxel; Rtxed, raltitrexed; Gem, gemcitabine; 5FU, 5-fluorouracil), spleens and tumors were harvested and MDSC infiltration was determined by FACS analysis. Graphics show the percentage of splenic and tumor infiltration MDSC and the absolute number of MDSC in spleen and tumors. B, effect of 5FU on other splenic cell populations. C, the percentages of monocytic (Ly6C<sup>hi</sup>Ly6G<sup>-</sup>) and granulocytic (Ly6C<sup>int</sup>Ly6G<sup>+</sup>) subpopulation of MDSC after 5FU treatment was determined by FACS analysis. Bottom, representative FACS. D, tumor-bearing mice were treated or not with 5FU, and spleens were harvested at various posttreatment times. Graphic shows the percentage of splenic MDSC. Columns, mean; bars, SEM. The experiments were performed twice with similar results,  $n = 4$  per group (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

some chemotherapeutic agents could promote Treg cell killing (24–26) or affect the biology of dendritic cells (27, 28). We therefore tested if, in addition to its action on MDSC, 5FU exerted some of these reported effects on the immune

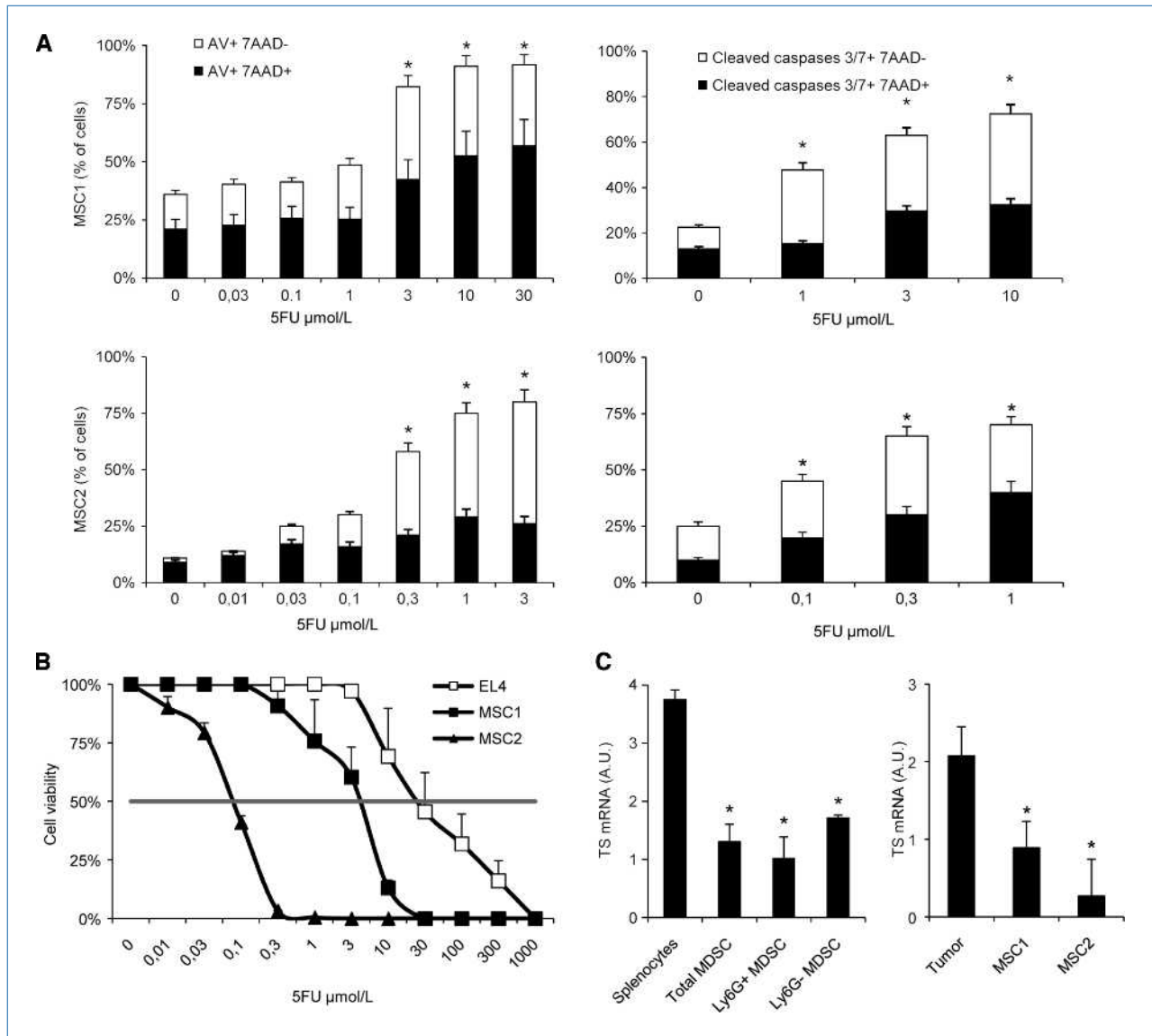
system. To this end, we first compared 5FU and cyclophosphamide for their ability to trigger regulatory T-cell depletion *in vivo*. Although cyclophosphamide administration led to a reduction in Treg numbers in the tumor bed and in the

spleen, 5FU had no such effect in the same setting (Fig. 3A). Similarly, we verified that 5FU (in contrast to mafosphamide) exerts no toxic effect on regulatory T cells *in vitro* (data not shown).

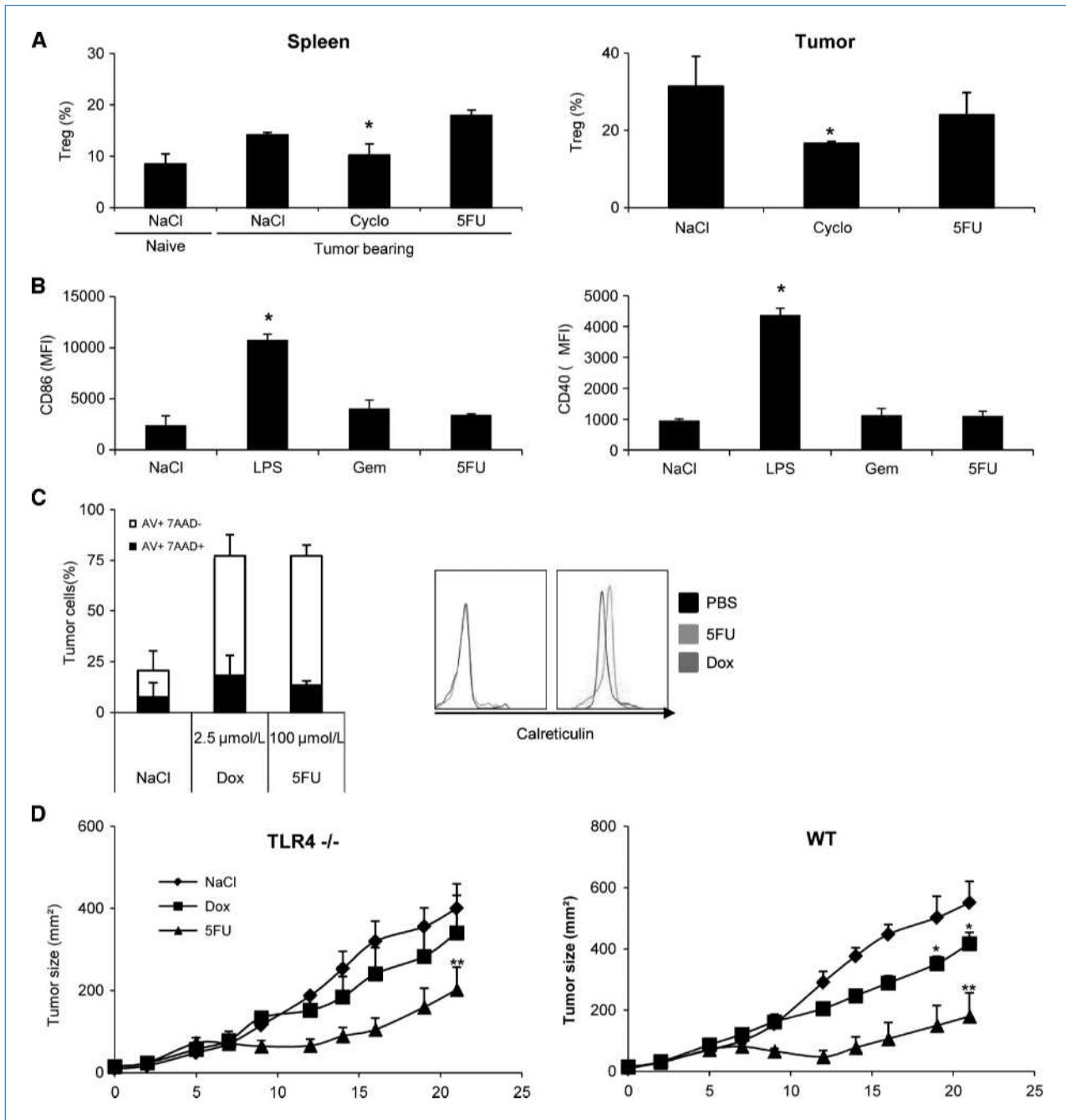
Cancer chemotherapy may also enhance the anticancer immune response by promoting the maturation of antigen-presenting cells. We thus tested the effect of a single systemic injection of 5FU, gemcitabine, or Gram-negative bacteria lipopolysaccharide on the maturation pattern of splenic dendritic cells. In this setting, although lipopolysaccharide induced a massive upregulation of CD86 and CD40, 5FU administration did not significantly alter the expression of

those markers, ruling out a putative involvement of 5FU in inducing dendritic cell maturation (Fig. 3B).

We have previously shown that the *in vivo* efficacy of doxorubicin relied on its ability to trigger an “immunogenic” cell death of cancer cells. Treatment of tumor cells by doxorubicin leads to the cell surface exposure of calreticulin, which is responsible for tumor cell phagocytosis, and to the release of HMGB1, which is critical for the Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated cross-presentation of tumor antigens from dendritic cells to T cells (29). To test the ability of 5FU to trigger an immunogenic form of cell death *in vivo*, we first monitored the expression of cell surface calreticulin on EL4 cells treated



**Figure 2.** 5FU induces MDSC apoptosis. A, the effect of 5FU on MSC1 and MSC2 cell lines was tested *in vitro* for apoptosis induction. FACS analysis of Annexin V/7-AAD staining (left) or activated caspase-3/7-AAD (right) staining results, respectively, in MSC1 (top) or MSC2 (bottom). B, compared dose-effect relation of 5FU-induced cell death on MSC cell lines and EL4 tumor cell lines. The experiments were performed thrice with identical results. C, quantitative RT-PCR for TS was performed on extracts from the indicated cellular preparation. Total MDSC were prepared as usual, granulocytic (Ly6G<sup>+</sup>) or monocytic (Ly6G<sup>-</sup>) cells were sorted by FACS from spleens of tumor-bearing mice. The experiments were performed twice with similar results (\*,  $P < 0.05$ ).



**Figure 3.** 5FU immunomodulatory effects are restrained to MDSC depletion. A, effect of 5FU or cyclophosphamide on Tregs. Mice bearing EL4 tumors either received no treatment (PBS) or one s.c. administration of cyclophosphamide (Cyclo) or 5FU. Splenic (top) or tumor-infiltrating (bottom) Tregs, respectively, 5 d after drug administration. B, effect of 5FU or gemcitabine on splenic dendritic cell maturation. Tumor-free mice received an injection of lipopolysaccharide (LPS), gemcitabine (Gem), or 5FU. Twenty-four hours after treatment, dendritic cells were isolated from the spleen and examined by flow cytometry after labeling with antibodies to CD86 (left) or CD40 (right). MFI, mean fluorescence index. C, tumor cells were treated with PBS, doxorubicin (Dox), or 5FU then mortality was evaluated with Annexin V/7-AAD labeling (left), membrane calreticulin presence was assayed by flow cytometry (right). D, effect of 5FU and doxorubicin on tumor growth in WT (right) or TLR4<sup>-/-</sup> (left) mice ( $n = 5$  per group). The experiments were performed twice with identical results (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

with 5FU or doxorubicin as a positive control. Although doxorubicin treatment could trigger cell surface expression of calreticulin, we failed to show any significant upregulation of calreticulin by treating EL4 cells with 5FU (Fig. 3C). We

then compared the effect of 5FU on EL4 tumor growth in wild-type (WT) and TLR4-deficient mice. Although the efficacy of doxorubicin was largely impaired in TLR4-deficient hosts, we observed that 5FU had a TLR4-independent

antitumor activity (Fig. 3D). These results suggest that the antitumor effects of 5FU cannot be explained by its ability to trigger an immunogenic form of tumor cell death. Altogether, these data show that the 5FU immune-mediated effects specifically rely on the elimination of MDSC.

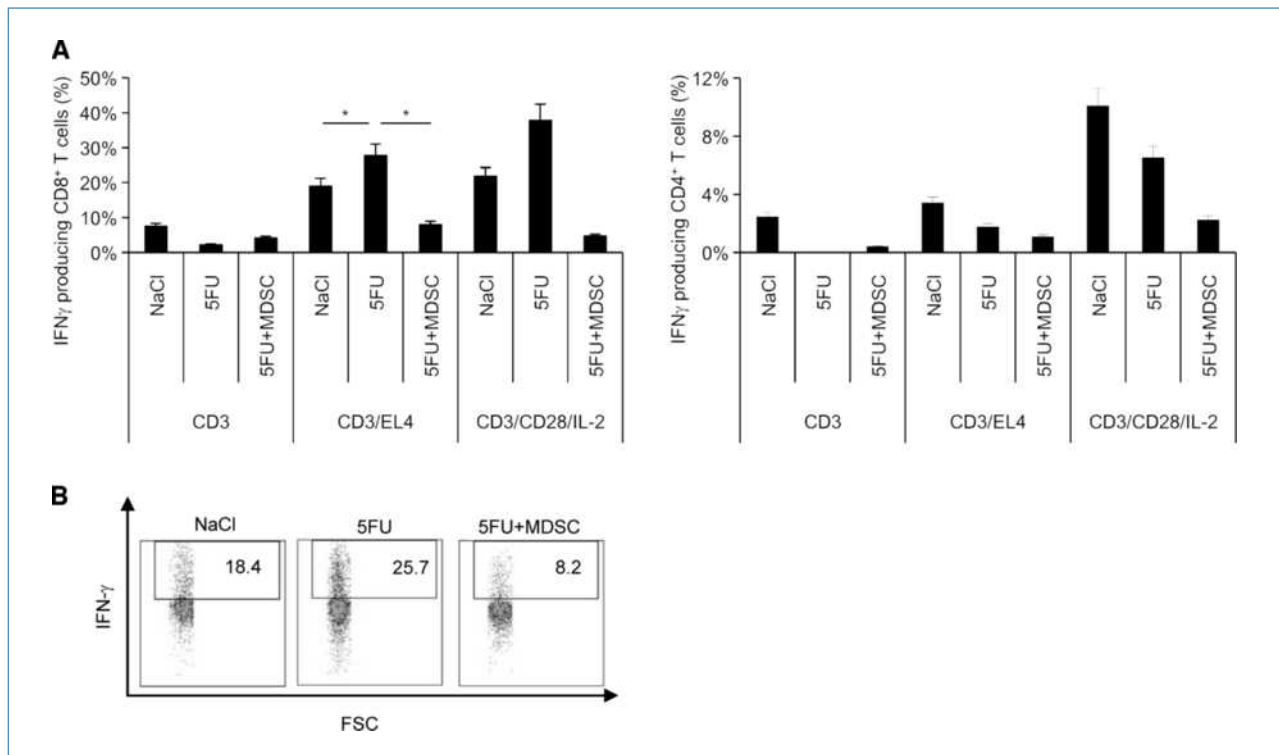
**5FU-induced specific activation of CD8<sup>+</sup> T cells.** As MDSC are known to inhibit antigen-dependent CD8<sup>+</sup> T cell proliferation and Tc1 differentiation (3), we tested whether 5FU could affect Th1- or Tc1-specific polarization in tumor-bearing animals. To this end, leukocytes from the spleen, tumor-draining lymph nodes, and tumor bed from EL4 tumor-bearing mice treated or not with 5FU were stimulated either with dead EL4 tumor cells or nonspecifically with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies. We then performed intracellular staining for IFN- $\gamma$  production. We did not detect any significant IFN- $\gamma$  production by either CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells obtained from spleen or draining lymph node of tumor-bearing animals, even after specific T-cell restimulation (data not shown). In contrast, antigen-specific restimulation of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells (but not CD4<sup>+</sup> T cells) produced detectable levels of IFN- $\gamma$ , which was enhanced after 5FU treatment of EL4 tumor-bearing mice (Fig. 4A and B). Moreover, adoptive transfer of MDSC from tumor-bearing mice drastically impeded IFN- $\gamma$  production by

CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 4A and B). These data collectively suggest that the selective cytotoxic activity of 5FU on MDSC could locally enhance the Tc1 polarization of CD8<sup>+</sup> T cells.

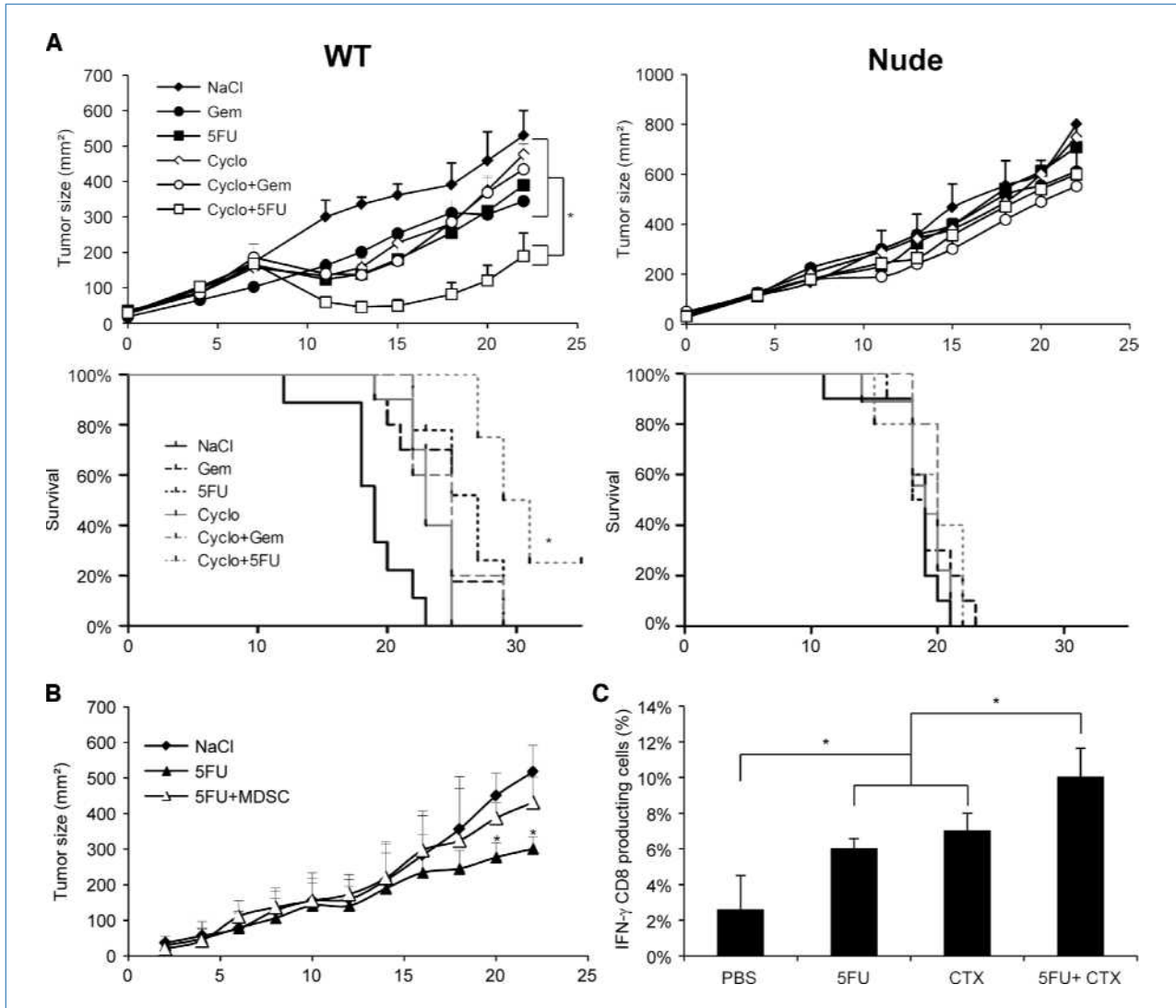
**5FU exerts an MDSC-dependent antitumor effect and acts synergistically with the depletion of regulatory T cells.**

We first treated WT or nude mice bearing a large EL4 tumor with gemcitabine or 5FU (Fig. 5A and B). These two treatments efficiently slowed down tumor growth in WT mice but exerted only a minor effect on tumor growth in nude mice (Fig. 5A and B). These data show that these chemotherapies depend on T cells to mediate their activity. In addition, we observed in WT mice bearing tumors that an adoptive transfer of MDSC from tumor-bearing mice 1 day after 5FU injection blunted the *in vivo* antitumor effect of 5FU (Fig. 5C). Altogether, these data suggest that 5FU exerts its activities through the elimination of MDSC and permits the restoration of T cell-dependent antitumor responses.

Tregs represent another population of immunosuppressive cells that exerts a major negative effect on antitumor immune response (25, 26, 30). We showed previously that a low dose of cyclophosphamide could deplete this population and restore latent antitumor immunity (25, 26). Cyclophosphamide had a T-dependent antitumor effect that was annihilated by an adoptive transfer of Treg cells (25, 30). These



**Figure 4.** 5FU-induced specific activation of CD8<sup>+</sup> T cells. A, EL4 tumor-bearing mice were treated with 5FU (or NaCl for controls; 50 mg/kg body weight) and injected (when indicated) with  $5 \times 10^6$  MDSC isolated from the spleen of tumor-bearing mice. Tumor-infiltrating leukocytes isolated 5 d after 5FU treatment were stimulated with immobilized anti-CD3 alone, anti-CD3 plus killed EL4 cells, or anti-CD3 plus anti-CD28 for 12 h. IFN- $\gamma$  production in tumor-infiltrating T CD8 (left) or T CD4 (right) lymphocytes, respectively. B, representative FACS showing the effect of 5FU treatment on IFN- $\gamma$  production by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from EL4 tumor infiltrate and its modulation by passive transfer of MDSC. The experiments were performed thrice with identical results (\*,  $P < 0.05$ ).



**Figure 5.** The antitumor effect of 5FU relies on MDSC. A, WT (left) or nude (right) mice were injected with  $2 \times 10^5$  EL4 cells and treated when tumor reached 100 mm<sup>2</sup> with one s.c. injection of the indicated chemotherapy. WT (left) or nude (right) mice, respectively. Tumor growth was measured every 2 d (top) and survival was monitored (bottom;  $n = 10$ ). B, WT mice were treated when tumor reached 200 mm<sup>2</sup> with one s.c. injection of 5FU (50 mg/kg) or 5FU plus an adoptive transfer of  $5 \times 10^6$  splenic MDSC cells from tumor-bearing mice ( $n = 10$ ). Top, tumor growth in each group; bottom, mice survival using Kaplan-Meier curves. The experiments were performed thrice with similar results. C, WT mice were injected with  $2 \times 10^5$  EL4 cells and treated when tumor reached 100 mm<sup>2</sup> with the combination of 5FU (50 mg/kg) plus cyclophosphamide (CTX, 80 mg/kg), or 5FU alone or were left untreated. Cells isolated from tumor-infiltrating lymphocytes were stimulated with anti-CD3 plus dead EL4 cells. Histogram represents the percentage of IFN- $\gamma$ -producing CD8 T cells in tumor-infiltrating CD8 T lymphocyte ( $n = 4$ ). The experiments were performed twice with similar results (\*,  $P < 0.05$ ).

data provided the impetus to combine Treg and MDSC depletion to enhance T-cell functions and antitumor responses. The two combinations (cyclophosphamide plus gemcitabine and cyclophosphamide plus 5FU) showed a synergistic effect in WT mice compared with monotherapies but had little or no effect on tumors growing in nude mice (Fig. 5A and B). Interestingly, the cyclophosphamide + 5FU combination showed a significantly superior antitumor effect compared with the cyclophosphamide + gemcitabine combination in immunocompetent mice, and mice survival was improved in the cyclophosphamide + 5FU group ( $P = 0.04$ , log rank test). In line with the *in vivo* results, we verified *ex vivo* that the com-

bination of 5FU and cyclophosphamide enhanced the number of tumor-specific IFN- $\gamma$  producing specific intratumoral CD8 T cells compared with monotherapies (Fig. 5D).

Altogether, these data show that cyclophosphamide and 5FU could exert a T-dependent synergistic antitumor effect and could lead to the cure of some animals bearing large tumors.

## Discussion

The recognition that immune suppression is crucial to promote tumor progression, which might explain the failure of some cancer vaccines, has resulted in a paradigm shift

regarding approaches to cancer immunotherapy. It indeed becomes clear that successful cancer immunotherapy will only be achieved when associated with the elimination of suppressive cells (31–33). Two major immunosuppressive cell types are mainly involved in tumor-induced immunosuppression: Tregs and MDSC. The elimination of Treg cells using a low dosage of cyclophosphamide as a metronomic regimen proved its efficacy in many rodent models as well as in humans (25, 26, 30, 34–37). Many strategies have been tested to dampen the immunosuppressive actions of MDSC, including treatments designed to favor their differentiation, or to inhibit their expansion or their inhibitory function (13, 38). However, the most promising results have been obtained with the selective depletion of these cells. Some groups tested the *in vivo* administration of monoclonal antibodies against Gr-1, aimed at depleting Gr-1<sup>+</sup> MDSC. This treatment gave interesting results in restoring T cell antitumor activity, both in terms of general reduction of tumor progression and in terms of prevention of relapse (39, 40). Unfortunately Gr-1 is not a specific marker of MDSC as it is also expressed in granulocytes, implying the possibility that tumor-bearing hosts treated with such depleting antibodies might undergo opportunistic infections. This consideration emphasizes the interest of screening drugs aimed at selectively depleting MDSC. It was recently shown that several cytotoxic agents used for cancer chemotherapy not only featured a direct cytotoxic effect on tumor cells, but also featured an interesting side effect by eliminating leukocyte subpopulations involved in the suppression of antitumor immunity (35). However, up to now, only gemcitabine has been shown to be able to eliminate MDSC, one of the major cell populations involved in tumor tolerance (14, 15).

Here, we show for the first time that 5FU was also able to reduce the number of MDSCs not only in the spleen but also in the tumor bed. The effect of 5FU on MDSC was obtained at low doses and seemed to be selective as we did not observe any *in vivo* drop in T cells, B cells, or dendritic cell numbers. This effect was mediated by inducing the apoptotic death of MDSC with activation of caspase-3 and caspase-7 both *in vitro* and *in vivo*. The effect of 5FU lasted for ~10 days *in vivo*, and could be related to a lower TS expression in this cell type. Moreover, the effect of 5FU on MDSC seemed more pronounced than the effect of gemcitabine, thus suggesting that this agent could be more efficient in enhancing antitumor immunity.

MDSC are well known inhibitors of CD8<sup>+</sup> T cell activation (3). We showed here for the first time that 5FU induces MDSC depletion and could enhance the intratumoral CD8<sup>+</sup> T cell antigen-specific capacity to produce IFN- $\gamma$ . This effect was reversed by adoptive transfer of MDSC thus providing the evidence that reinfused MDSC could migrate to the tumor and blunt T cell reactivity *in situ*. When monitoring

tumor growth, we observed that its inhibition by 5FU was strictly dependent on T cells and was also completely hindered by MDSC transfer. Based on these results, we propose that most of the antitumor effect of 5FU could be explained by its capacity to eliminate MDSC and restore CD8<sup>+</sup> cell capacity to produce IFN- $\gamma$ . Finally, we have shown that the association of Treg and MDSC depletion obtained with cyclophosphamide and 5FU, respectively, has a synergistic effect on the suppression of tumor growth. This data is of importance because it shows that therapies acting on tumor immunosuppression may be sufficient to restore T-cell function and obtain therapeutic effects. The antitumor activity obtained by the 5FU-cyclophosphamide association in our experimental tumor model strongly suggests that controlling tumor-induced tolerance is at least of equal importance as activating tumor immunity with a tumor vaccine for the purpose of obtaining immune eradication of cancers.

5FU, an analogue of uracil, the metabolites of which misincorporate in RNA and DNA and inhibit TS, is a cytotoxic agent widely used in the treatment of colorectal and breast cancers, as well as cancers of the aerodigestive tract (21). Its efficacy in cancer chemotherapy is currently considered to result directly from its toxic effect on tumor cells. Here, we report that 5FU could also hinder tumor growth by selectively destroying the tumor-associated MDSC, thus inhibiting their suppressive effect on the T cell-mediated control of the tumor. Even if this effect was briefly discussed in a very recent review (33), our report is the first one to actually bring up experimental evidence on the cytotoxic effect of 5FU on MDSC. Interestingly, in our experimental tumor model, the effect of 5FU on MDSC was predominant over its direct effect on tumor cells, thus explaining why the antitumor effect of 5FU is hampered by MDSC adoptive transfer. In summary, the results of our study would support the addition of 5FU to the expanding list of chemotherapeutic agents whose antitumor effects depend, at least in part, on their capability to enhance the anticancer immune response (16).

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Grant Support

Fondation de France, ARC, Ligue Départementale Comité de Cote d'Or; ARC (G. Mignot); Conseil Régional Bourgogne/INSERM (F. Chalmin); and the European Molecular Biology Organization (L. Apetoh).

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 10/06/2009; revised 01/12/2010; accepted 01/27/2010; published OnlineFirst 04/06/2010.

## References

- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 2009;182:4499–506.
- Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2007;67:425, author reply 6.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:162–74.

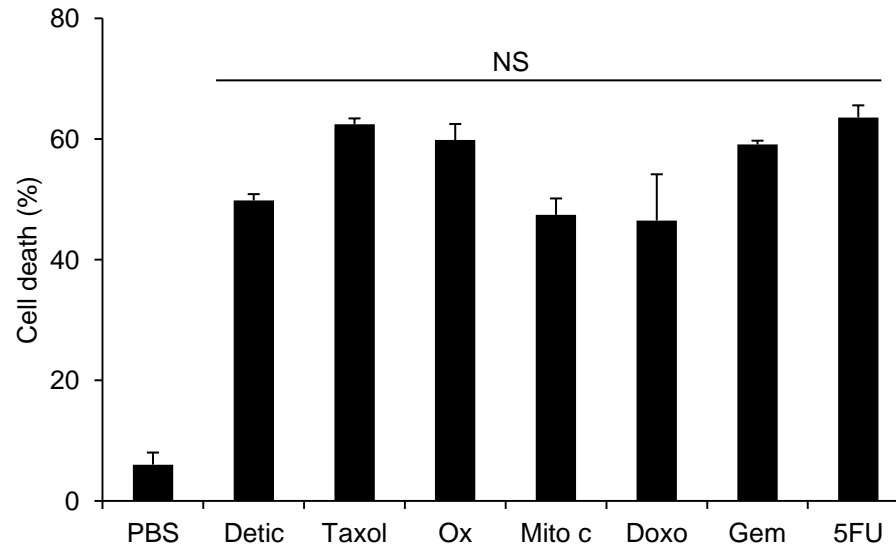
4. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* 2006;116:2777–90.
5. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 2005;202:931–9.
6. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007;13:828–35.
7. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol* 2003;74:186–96.
8. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, et al. IL4R $\alpha$ + myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol* 2009;182:6562–8.
9. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 2008;181:5791–802.
10. Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 2008;111:4233–44.
11. Almand B, Clark JI, Nikitina E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001;166:678–89.
12. Bronte V, Serafini P, Apolloni E, Zanovello P, et al. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. *J Immunother* 2001;24:431–46.
13. 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.
14. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 2005;11:6713–21.
15. Ko HJ, Kim YJ, Kim YS, et al. A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Res* 2007;67:7477–86.
16. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:59–73.
17. Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, Kroemer G, Zitvogel L. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 2008;14:141–51.
18. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 2009;28:578–90.
19. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, et al. Membrane Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates pStat3 dependent immunosuppressive function of myeloid derived suppressor cells. *J Clin Invest* 2010;120.
20. Apolloni E, Bronte V, Mazzoni A, et al. Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes. *J Immunol* 2000;165:6723–30.
21. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330–8.
22. Peters GJ, van der Wilt CL, van Triest B, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 1995;31A:1299–305.
23. van Kuilenburg AB, De Abreu RA, van Gennip AH. Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Biochem* 2003;40:41–5.
24. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$ -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005;202:919–29.
25. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004;34:336–44.
26. Roux S, Apetoh L, Chalmin F, et al. CD4+CD25+ Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. *J Clin Invest* 2008;118:3751–61.
27. Tanaka H, Matsushima H, Nishibu A, Clausen BE, Takashima A. Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation. *Cancer Res* 2009;69:6987–94.
28. Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol* 2009;183:137–44.
29. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13:1050–9.
30. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- $\beta$ -dependent manner. *J Exp Med* 2005;202:1075–85.
31. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007;117:1167–74.
32. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:641–8.
33. Ugel S, Delpozzo F, Desantis G, et al. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:470–81.
34. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 2005;105:2862–8.
35. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1219–28.
36. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, et al. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 2005;201:1591–602.
37. Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 2004;200:771–82.
38. Serafini P, Meckel K, Kelso M, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 2006;203:2691–702.
39. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, et al. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* 1999;162:5728–37.
40. Terabe M, Matsui S, Park JM, et al. Transforming growth factor- $\beta$  production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 2003;198:1741–52.



Annexe 2 : Données supplémentaires de l'article « Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. »

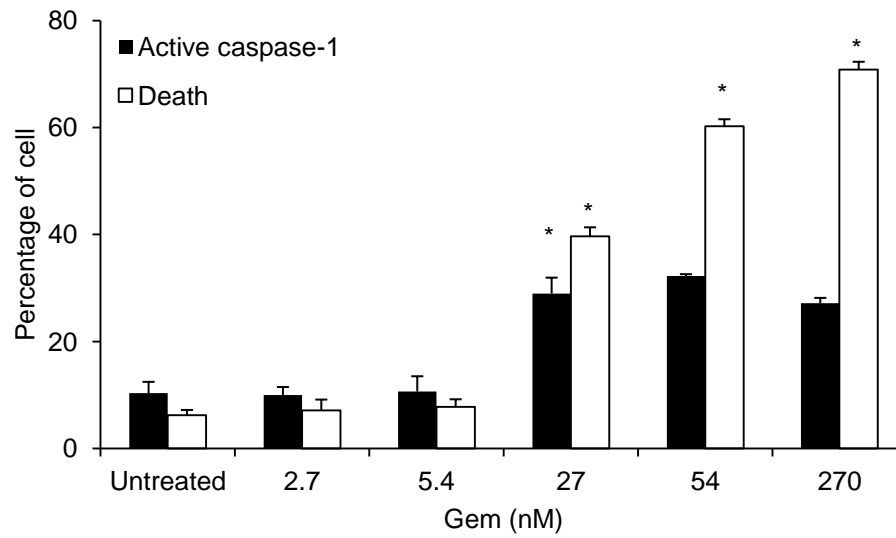
## Chemotherapy-triggered Cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth

Mélanie Bruchard<sup>1,2,8</sup>, Grégoire Mignot<sup>1,2,8</sup>, Valentin Derangère<sup>1,2</sup>, Fanny Chalmin<sup>1,2</sup>, Angélique Chevriaux<sup>1,2,3</sup>, Frédérique Végran<sup>1,2</sup>, Wilfrid Boireau<sup>4</sup>, Benoit Simon<sup>4</sup>, Bernhard Ryffel<sup>5</sup>, Jean Louis Connat<sup>6</sup>, Jean Kanellopoulos<sup>7</sup>, François Martin<sup>1,2</sup>, Cédric Rébé<sup>1,2,3</sup>, Lionel Apetoh<sup>1,2,3,8</sup> and François Ghiringhelli<sup>1,2,3,8</sup>.



### Supplementary Figure 1: MSC-2 cell death by chemotherapeutic drugs.

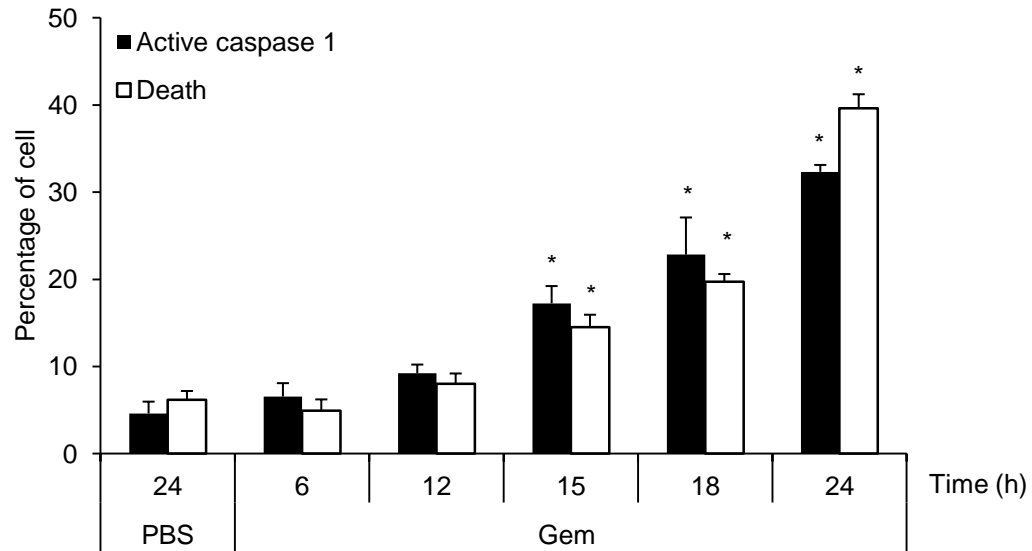
MSC-2 cells were treated with PBS, Deticene (Detic) at 430 $\mu$ M, Taxol at 175 nM, Oxaliplatin (Ox) at 2.5 $\mu$ M, Mitomycin C (Mito C) at 3 $\mu$ M, Doxorubicin (Doxo) at 73nM, Gem at 27nM or 5FU at 1 $\mu$ M for 24 hours. Cell death was assessed using AnnexinV/ DAPI Staining. Data are representative of one out of three experiments. \*Indicates  $p < 0.05$



**Supplementary Figure 2: Gem induces cell death and Caspase-1 activation in MSC-2 cells.**

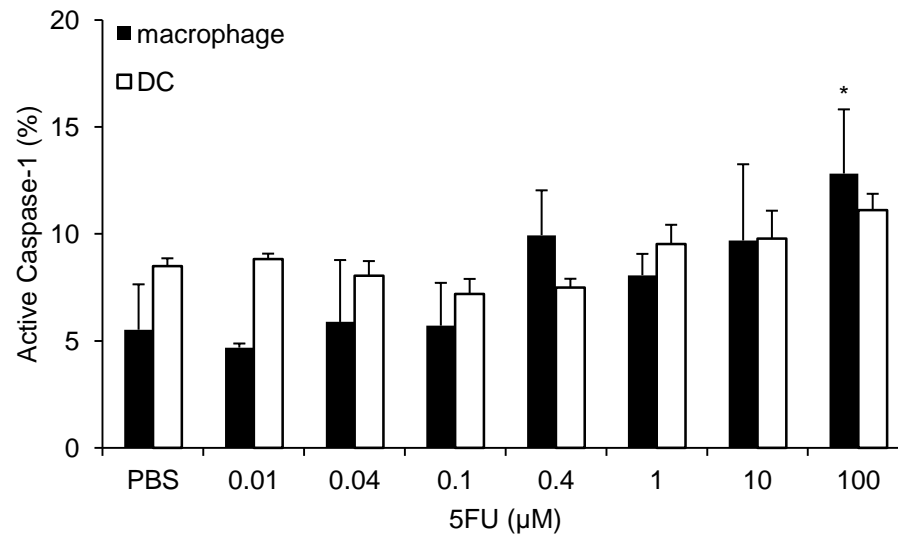
MSC-2 cells were treated with increasing doses of Gem. Cell death and Caspase-1 activation were assessed after 24 hours using Annexin V/ DAPI or fluorescent probes respectively.

Data are representative of one out of four experiments. \*Indicates  $p < 0.05$



**Supplementary Figure 3: Kinetic of Caspase-1 activation and cell death after Gem treatment.**

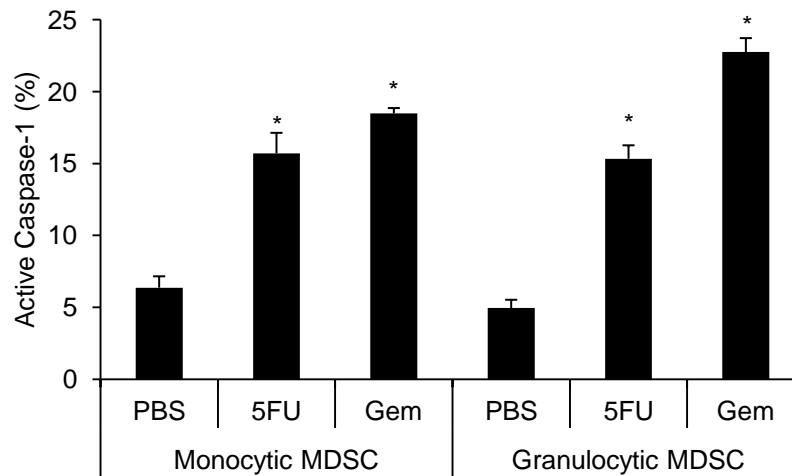
MSC-2 cells were treated with Gem at 27nM for the indicated time periods. Cell death and Caspase-1 activation were assessed as in fig. S2. Data are representative of one out of four experiments. \*Indicates  $p < 0.05$



**Supplementary Figure 4: 5FU does not activate Caspase-1 in dendritic cells and macrophages.**

Dendritic cells generated from Bone Marrow derived dendritic cells cultured with GM-CSF + IL-4 and peritoneal macrophages were treated with increasing doses of 5FU for 24 hours. Caspase-1 activation was measured using fluorescent probes.

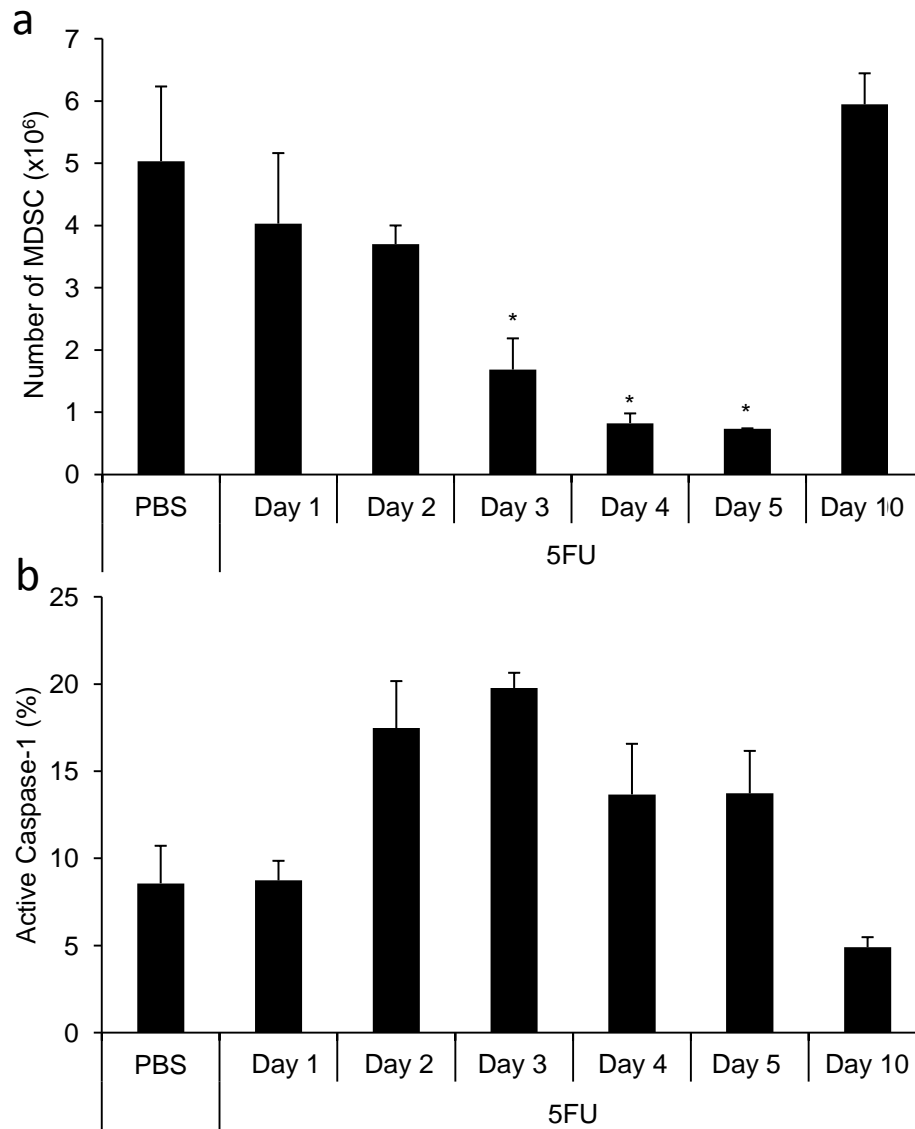
Data are representative of one out of three experiments. \*Indicates p<0.05



**Supplementary Figure 5: 5FU and Gem activate Caspase-1 in both monocytic and granulocytic MDSC.**

EL4 tumor bearing mice were treated with PBS, 5FU (50mg.kg<sup>-1</sup>) or Gem (120mg.kg<sup>-1</sup>). After 24H Caspase-1 activation was determined in splenic monocytic (CD11b<sup>+</sup>ly6C<sup>+</sup>ly6G<sup>low</sup>) and granulocytic (CD11b<sup>+</sup>ly6C<sup>low</sup> ly6G<sup>high</sup>) MDSC using Flica 1 fluorescent probe.

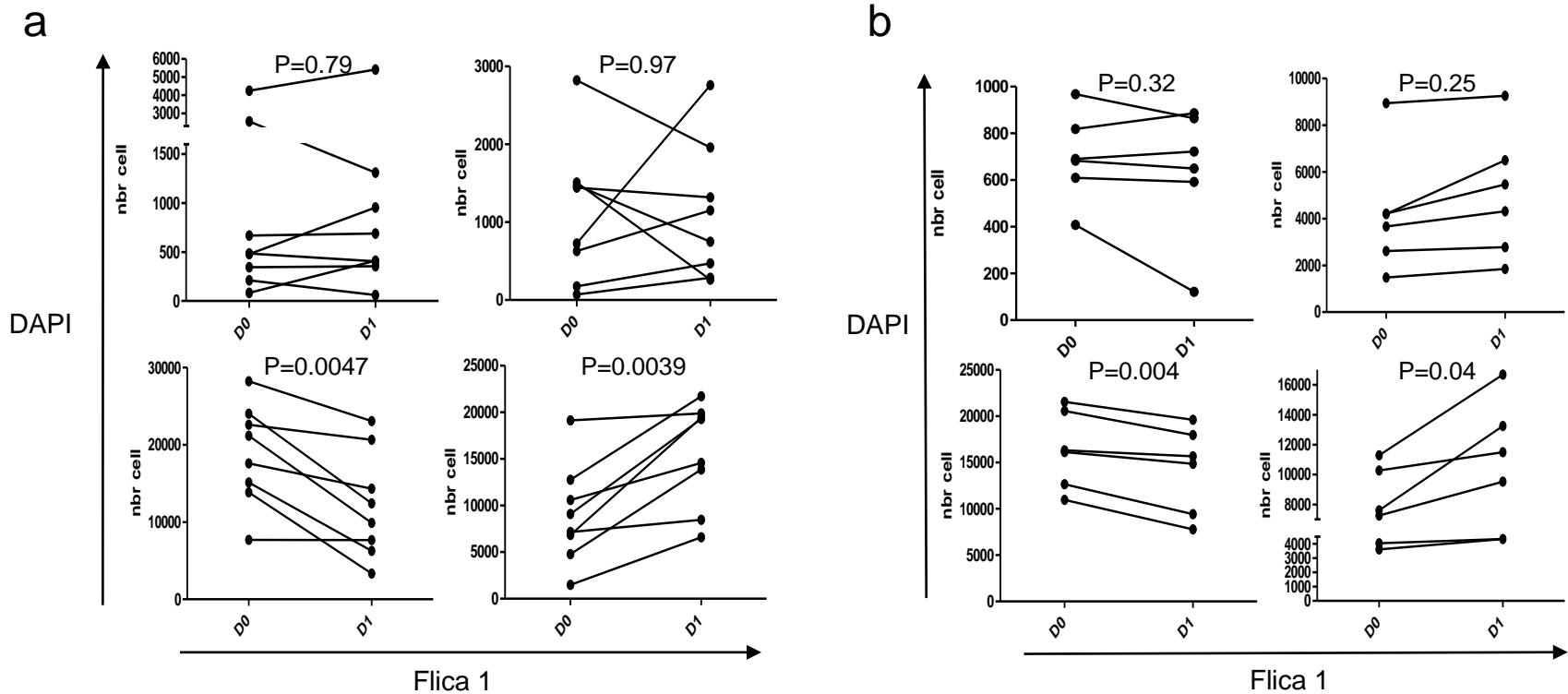
Data are representative of one out of three experiments. \*Indicates p<0.05



**Supplementary Figure 6: Evolution of Caspase-1 activation and splenic MDSC number after a 5FU treatment *in vivo*.**

EL4 tumor bearing mice were treated with PBS or 5FU (50mg.kg<sup>-1</sup>). After 1, 2, 3, 4, 5 or 10 days (a). enumeration and (b). Caspase-1 activation using FLICA 1 fluorescent probe of splenic MDSC were determined by flow cytometry.

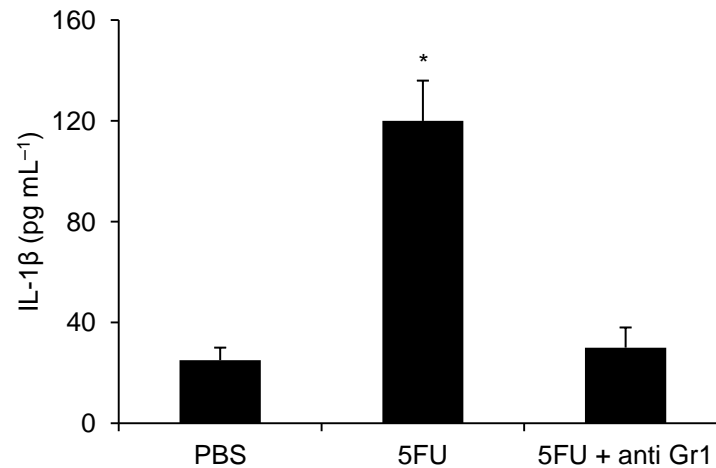
Data are representative of one out of four experiments. \*Indicates p<0.05



### Supplementary Figure 7: Death and Caspase-1 activation in human MDSC

(a) Colon cancer patients' PBMC were obtained on 2 consecutive days before and after 5FU treatment. Caspase-1 activation using FLICA and death using DAPI in HLA DR<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD33<sup>+</sup> MDSC was shown in 8 different patients. (DAPI<sup>+</sup> FLICA<sup>-</sup> upper left; DAPI<sup>-</sup> FLICA<sup>-</sup> lower left; DAPI<sup>+</sup> FLICA<sup>+</sup> upper right; DAPI<sup>-</sup> FLICA<sup>+</sup> lower right). (b) Caspase-1 activation using FLICA and death using DAPI in HLA DR<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD33<sup>+</sup> MDSC after *in vitro* 5FU treatment is shown in 5 different patients. (DAPI<sup>+</sup> FLICA<sup>-</sup> upper left; DAPI<sup>-</sup> FLICA<sup>-</sup> lower left; DAPI<sup>+</sup> FLICA<sup>+</sup> upper right; DAPI<sup>-</sup> FLICA<sup>+</sup> lower right).

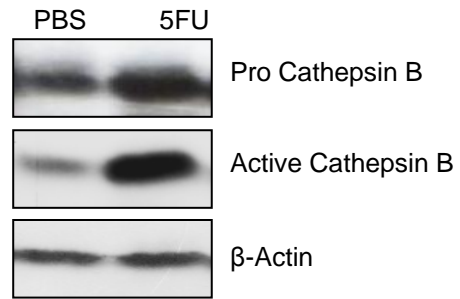




**Supplementary Figure 8: IL-1 $\beta$  release following 5FU treatment originates from MDSC.**

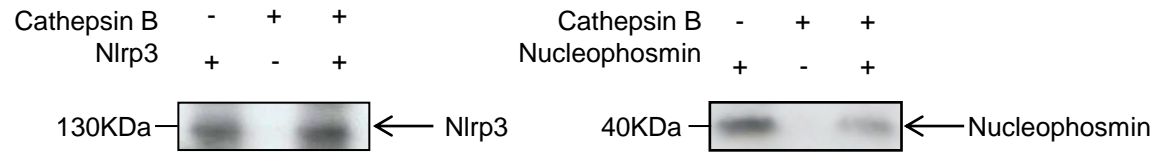
EL4 tumor bearing mice were treated twice with anti Gr1 mAb or isotype control eight and nine days after tumor cells injection. One day later, they received PBS or 5FU at 50mg.kg<sup>-1</sup>. IL-1 $\beta$  was detected in the serum using ELISA after five days.

Data are representative of one out of two experiments. \*Indicates p<0.05



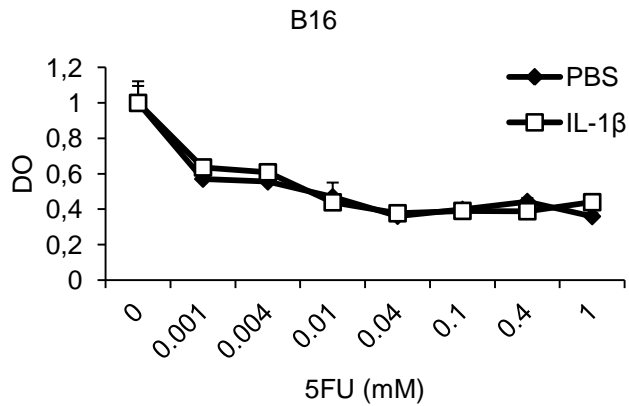
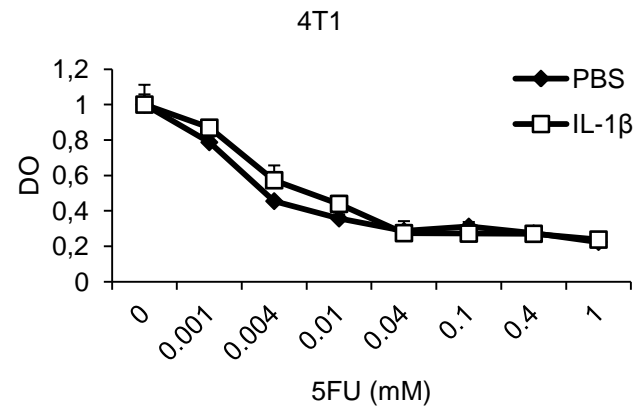
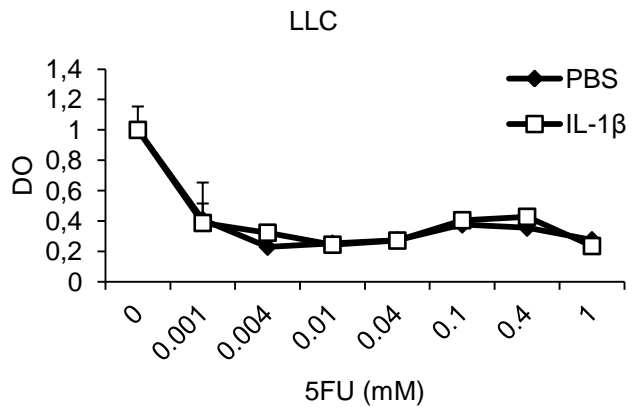
**Supplementary Figure 9: 5FU induces active Cathepsin B in MDSC.**

EL4 tumor bearing WT mice were treated with 5FU. After two days, Cathepsin B activation in cell-sorted splenic MDSC was assessed by western blotting.



**Supplementary Figure 10: Active Cathepsin B fails to cleave NLRP3.**

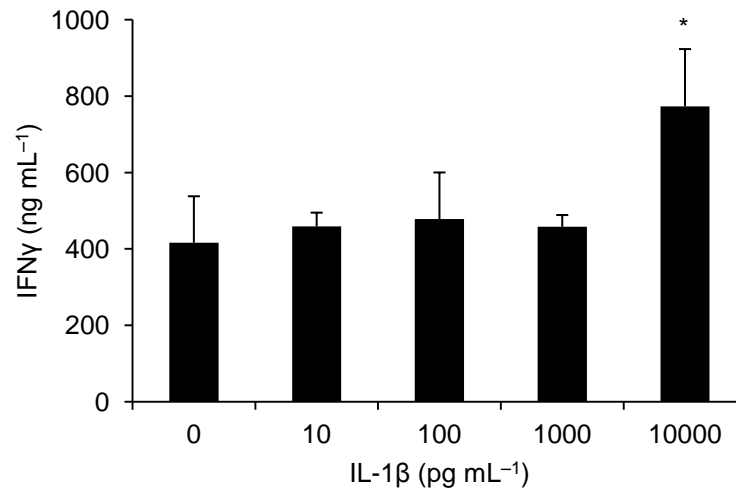
Recombinant mouse Nlrp3 protein or VSV tagged Nucleophosmin were synthesized *in vitro* using a cell free system and incubated with recombinant mouse Cathepsin B for 2 hours. Western blotting was performed using anti-Nlrp3 (left panel) or anti-VSV antibodies (right panel).



**Supplementary Figure 11: IL-1 $\beta$  does not alter tumor cell viability after 5FU treatment.**

LLC, 4T1 and B16 cells viability was assessed by crystal violet after two days following treatment with increasing doses of 5FU and 200pg.mL<sup>-1</sup> of IL-1 $\beta$ .

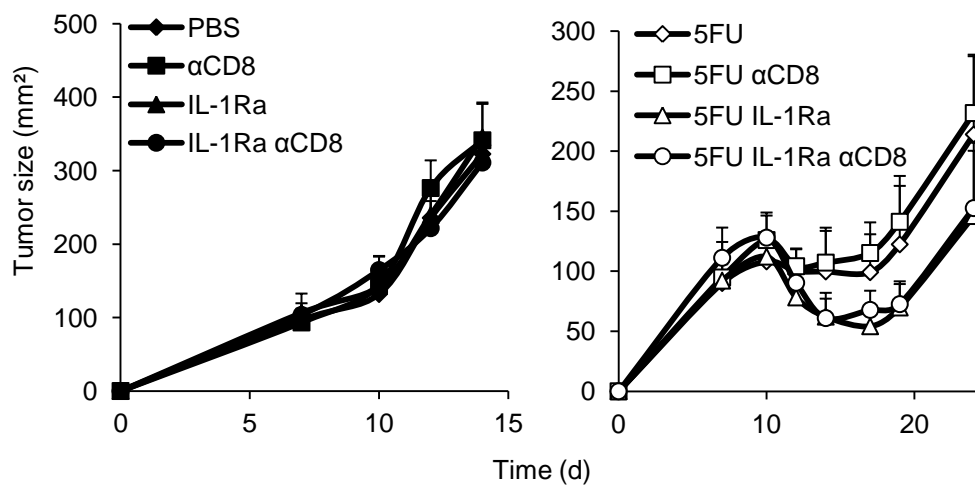
Data are representative of one out of four experiments. \*Indicates p<0.05



**Supplementary Figure 12: High doses of IL-1 $\beta$  are necessary to induce effector CD8 T cells.**

Effector CD8 $^{+}$  T cells were generated from naïve CD8 $^{+}$  T cells stimulated with plate-bound antibodies against CD3 and CD28 and IL-12 (10ng.mL $^{-1}$ ) and with increasing doses of IL-1 $\beta$ . IFN $\gamma$  production was measured by ELISA after three days.

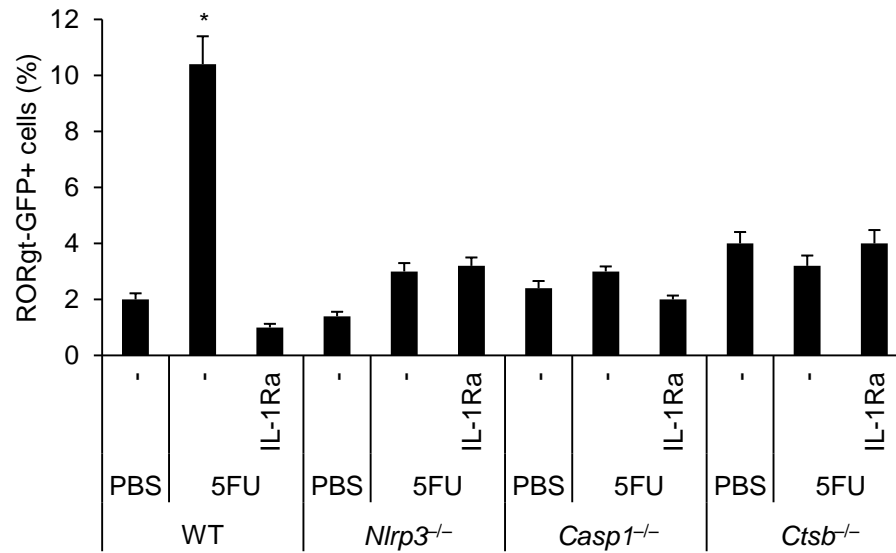
Data are representative of one out of three experiments. \*Indicates p<0.05



**Supplementary Figure 13: CD8<sup>+</sup> depletion fails to improve 5FU treatment.**

EL4 tumor bearing WT mice depleted in CD8<sup>+</sup> T cells treated with PBS or IL-1Ra (1.5mg.kg<sup>-1</sup>) three times a week, received PBS (left panel) or 5FU at 50mg.kg<sup>-1</sup> ten days after tumor cell injection. Tumor growth was monitored three times a week.

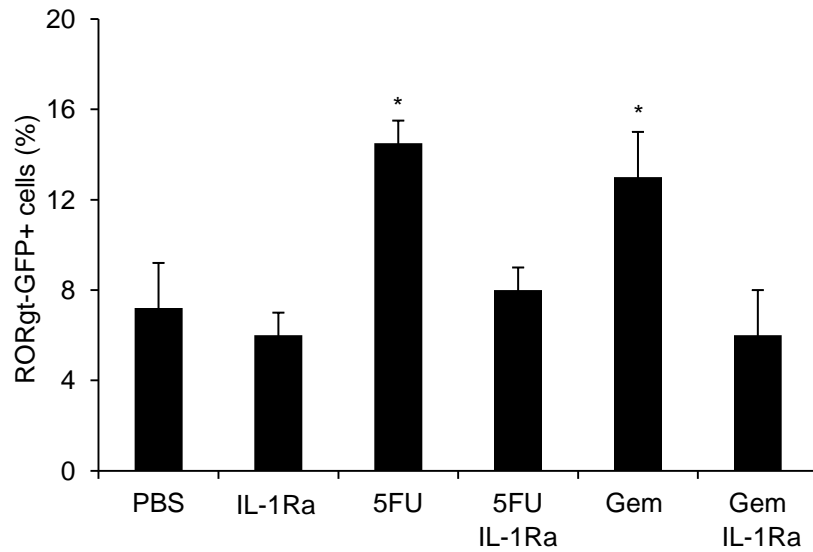
Data are representative of one out of two experiments. \*Indicates p<0.05



**Supplementary Figure 14: MDSC-derived IL-1 $\beta$  induces ROR $\gamma$ t-GFP expressing CD4<sup>+</sup> T cells.**

EL4 tumor bearing WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp1*<sup>-/-</sup>, *Ctsb*<sup>-/-</sup> mice were treated with PBS or 5FU (50mg.kg<sup>-1</sup>). After 48 hours, splenic MDSC were cultured with naïve CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T cells from Ror $\gamma$ t-GFP mice activated in presence of anti-CD3 (5 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) and anti-CD28 (5 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) antibodies in the absence or presence of IL-1Ra (10nM). GFP expression in CD4<sup>+</sup> T cells was determined by flow cytometry.

Data are representative of one out of three experiments. \*Indicates p<0.05

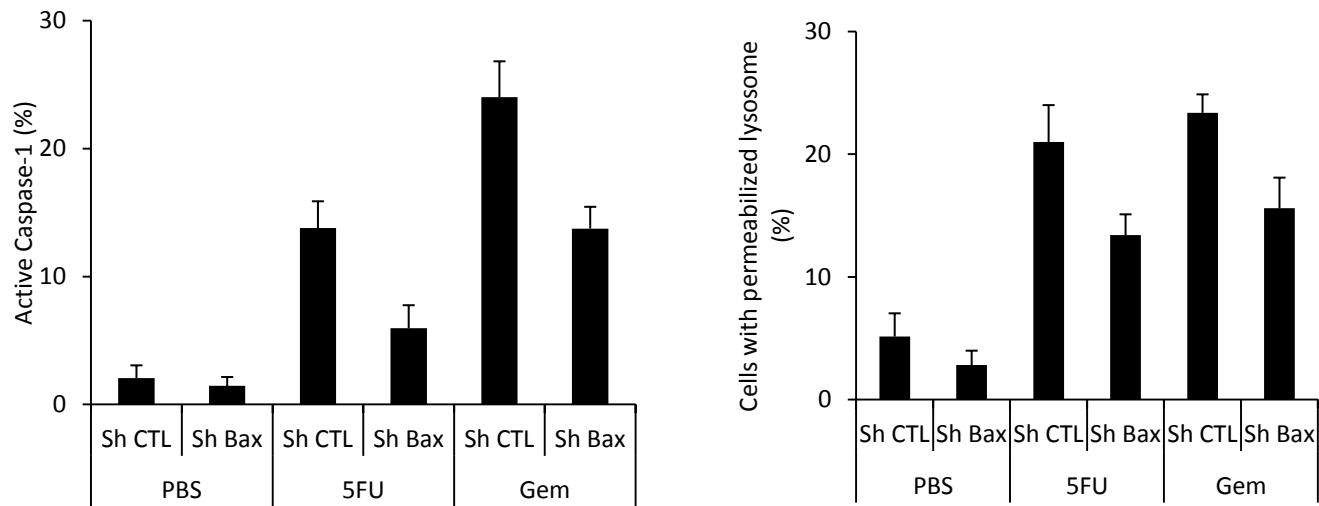


**Supplementary Figure 15: Induction of RORγt-GFP<sup>+</sup> cells after 5FU or Gem treatment is IL-1-dependent.**

EL4 tumor bearing RORγt-GFP mice were treated with PBS, 5FU (50mg.kg<sup>-1</sup>) or Gem (120mg.kg<sup>-1</sup>) with or without IL-1Ra. After five days, draining lymph node cells were harvested and activated in presence of anti-CD3 (5μg.mL<sup>-1</sup>) and anti-CD28 (2μg.mL<sup>-1</sup>) antibodies. Percentage of RORγt-GFP<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T cells was determined by Flow cytometry.

Data are representative of one out of three experiments. \*Indicates p<0.05

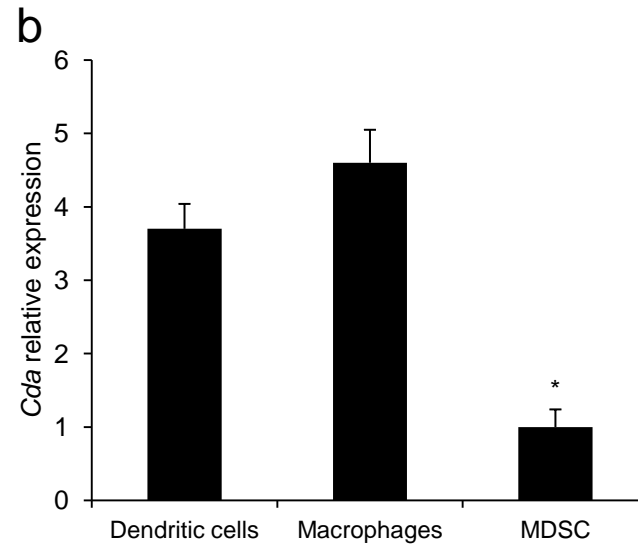
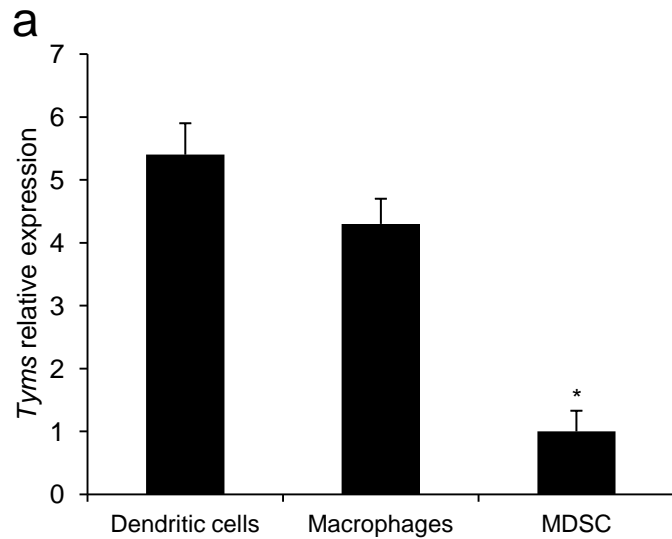




**Supplementary Figure 16: Bax inactivation blunts Caspase-1 activation and lysosome permeabilization.**

MSC-2 cells were transduced with control Sh RNA or Bax Sh RNA and treated with PBS, 5FU (1 $\mu$ M) or Gem (27nM) for 24 hours. Caspase-1 activation and lysosome permeabilization were measured by flow cytometry.

Data are representative of one out of four experiments. \*Indicates p<0.05



**Supplementary Figure 17: MDSC expression of Thymidylate synthase and Cytidine deaminase.**

(a) Expression of Thymidylate synthase was determined in Dendritic cells, macrophages and MDSC, using quantitative RT-PCR. (b) Expression of Cytidine deaminase was determined in Dendritic cells, macrophages and MDSC, using quantitative RT-PCR.

Data are representative of one out of three experiments. \*Indicates  $p < 0.05$

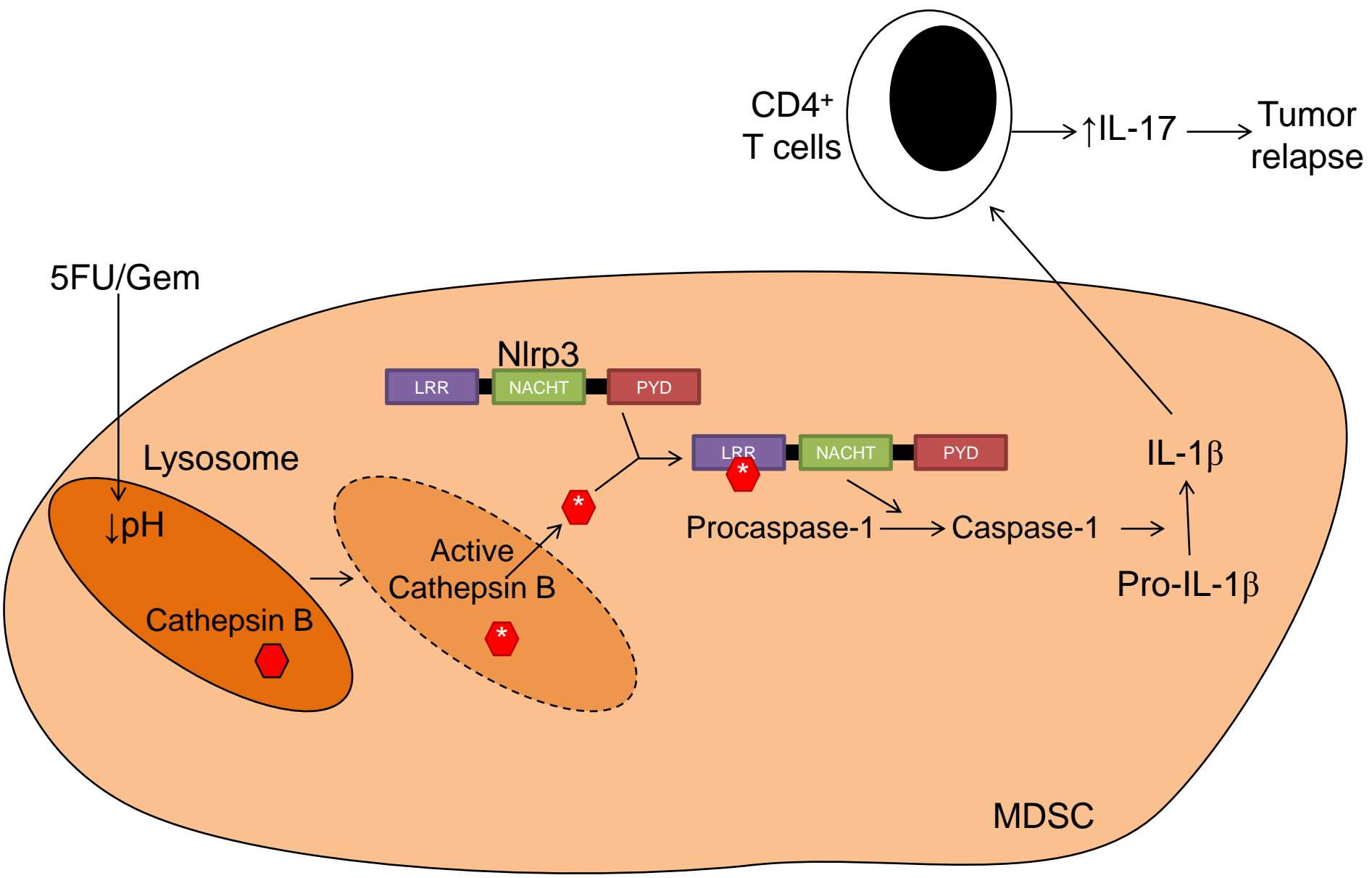
strain	Treatment	Nb of cured mice/total	% of cured
WT	PBS	0/55	0%
	anti Gr-1	0/8	0%
	5FU	4/44	9%
	5FU + anti Gr-1	0/10	0%
	IL-1Ra	0/51	0%
	IL-1Ra + anti Gr-1	0/10	0%
	IL-1Ra + 5FU	16/35	46%
	IL-1Ra +5FU + anti Gr-1	0/12	0%
<i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup>	PBS	0/30	0%
	anti Gr-1	0/8	0%
	5FU	11/31	35%
	5FU + anti Gr-1	0/10	0%
<i>Casp1</i> <sup>-/-</sup>	PBS	0/25	0%
	anti Gr-1	0/8	0%
	5FU	9/20	45%
	5FU + anti Gr-1	0/12	0%

**Supplementary table 1: Role of MDSC in the curative effect of 5FU in EL4 model in different strains of mice.**

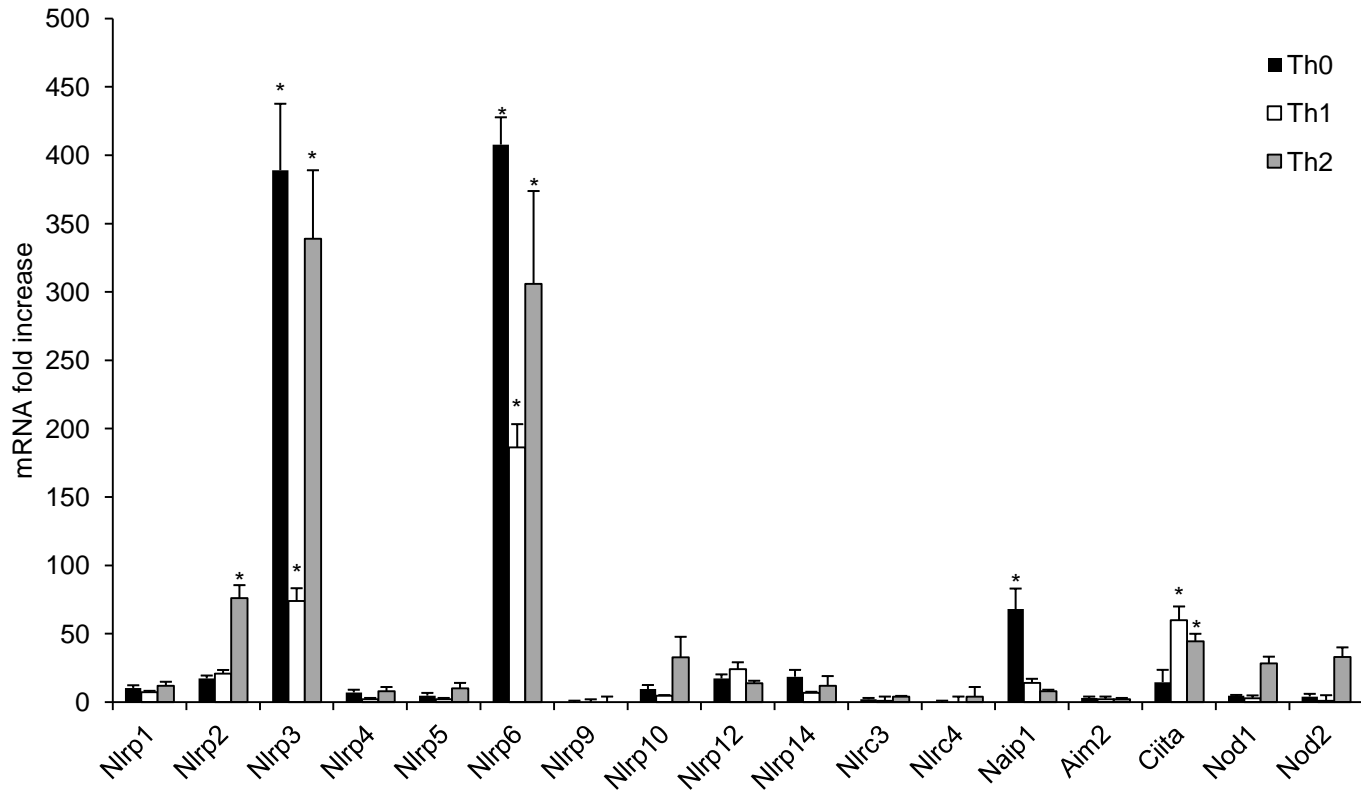
Number and percentage of cured mice from different strains treated with PBS or 5FU associated or not with IL-1Ra or with anti-Gr1 60 days after tumor cell injection.

	Forward 5' → 3'	Reverse 3' → 5'
<u>PCR:</u>		
<i>Rorc</i>	ggaagtcaatgtgggatg	taggacgactccattgctc
<i>Il17a</i>	tgagctcccagatcacaga	tccagaaggccctcagacta
<i>Cd3e</i>	atgcggtggaacactttct	gtgcttatcatgcttctgagg
<i>Eng</i>	atgcctgaagagtcagctcc	gtgtagctcaggctccaat
<i>Pecam1</i>	agttgctgcccattcatcac	ctggtgctctatgcaagcct
<i>Actb</i>	atggagggaatacagccc	ttcttgcagctccttcgtt
<i>Tyms</i>	caatggatcccagattttc	gtcatcagggttggtttga
<i>Cda</i>	aggatcttctcgggtgcaa	cagtcggtgccaaactctct
<u>Mutagenesis</u>		
ΔPYD	tatacgctggaatgacacgtgtacatcaca	tatacgctggacactcgtcatctcagca
ΔLRR	tatacgcttggtgaattccggccttact	tatacgctagccttttcaaactgccc
ΔNACHT	tatacgctcaggctgatccaagagaatga	tatacgctaacagcagctccagcttaagg

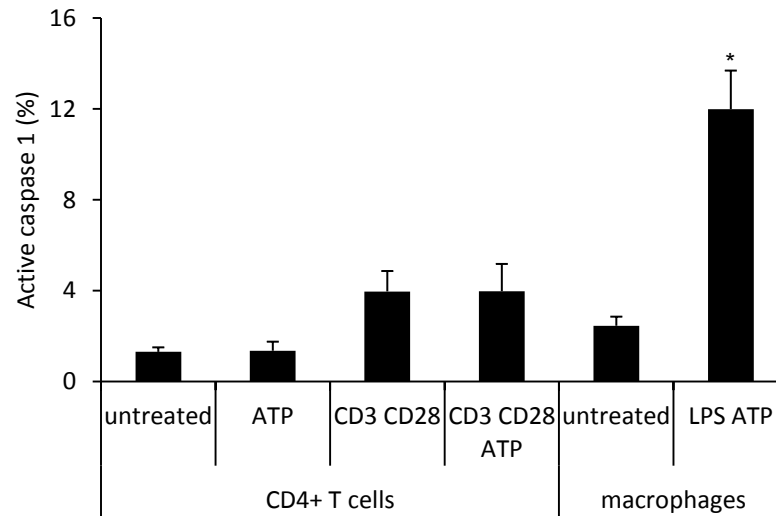
**Supplementary table 2: Sequences of oligonucleotides used.**



Annexe 3 : Données supplémentaires de l'article « NLRP3 protein is a transcriptional regulator of Th2 differentiation »



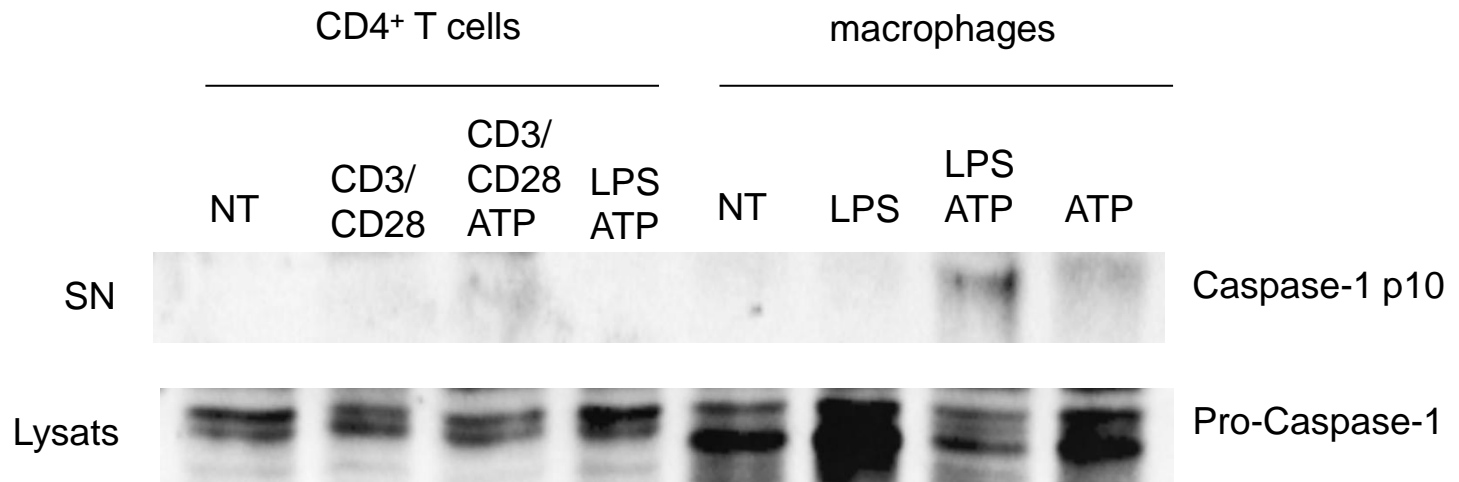
SD1: mRNA expression analysis of NLR genes in WT naive CD4<sup>+</sup> T cells after 12h hours of stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 mAb.



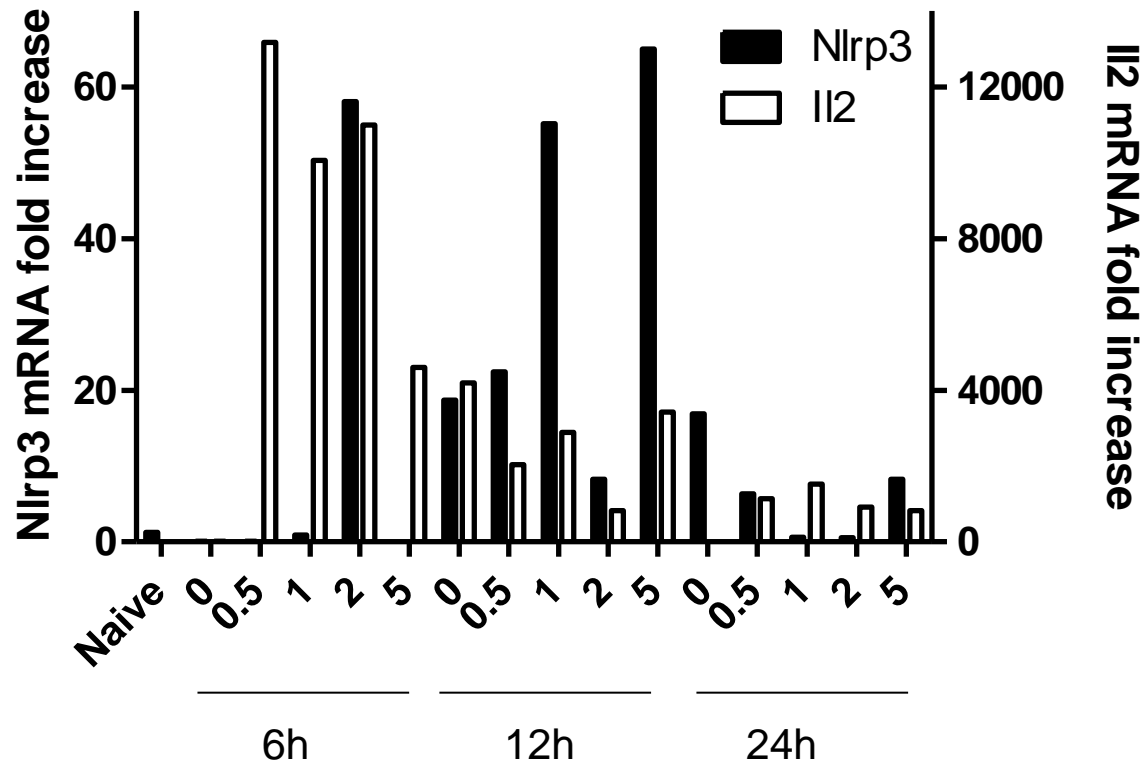
SD2 : Caspase-1 activation was measured by flow cytometry in naive CD4<sup>+</sup> T cells activated or not with anti-CD3 and anti-CD28mAb for one day and with ATP (5mM) during the last hour or in macrophages untreated or treated with LPS (10ng/mL) for one day then ATP (5mM) for one hour.



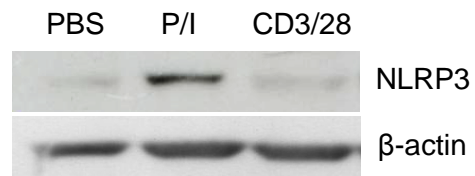
# SD3



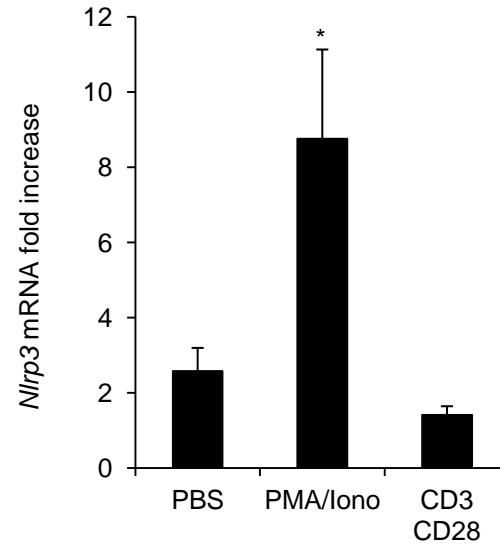
SD3 : Western blot detecting Caspase-1 activation in naive CD4<sup>+</sup> T cells activated or not with anti-CD3 and anti-CD28mAb or LPS (10ng/mL) for one day and with ATP (5mM) during the last hour or in macrophages untreated or treated with LPS for one day then treated with ATP (5mM) for the last hour.



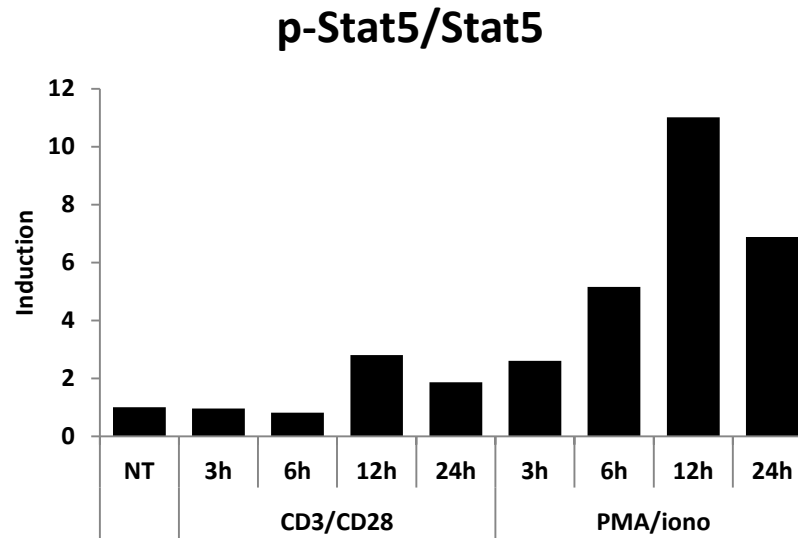
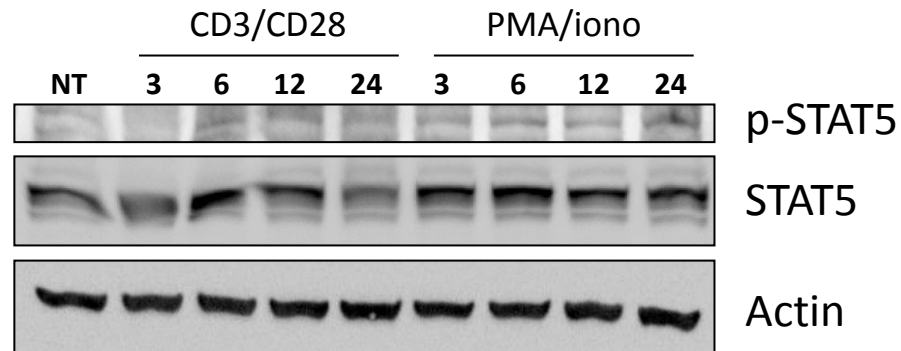
SD4 : *Nlrp3* and *Il2* mRNA expression in naive CD4<sup>+</sup> T cells stimulated with anti-CD28 and increasing doses of anti-CD3 mAb for the indicated time.



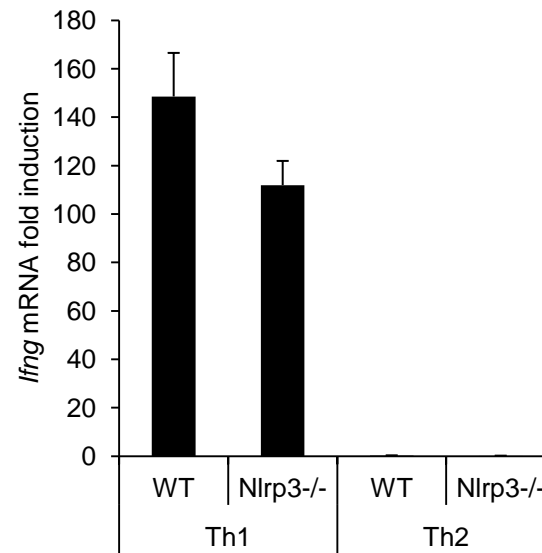
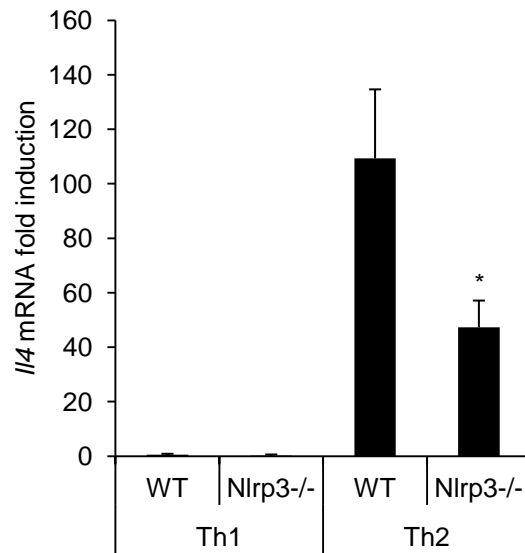
SD5: Western blot analysis of NLRP3 expression in EL4 T cell clone after 24 hours of PMA/Ionomycin or anti-CD3 and anti-CD28 stimulation.



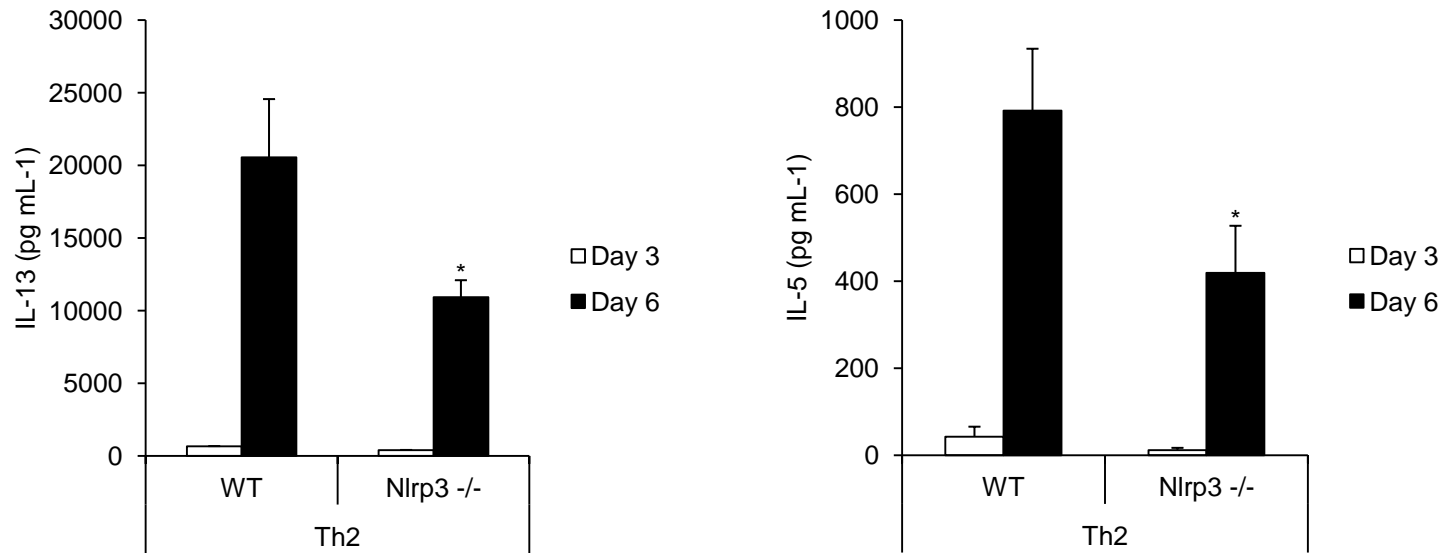
SD6: *Nlrp3* mRNA analysis in EL4 T cell clone after 24 hours of PMA/Ionomycin or anti-CD3 and anti-CD28 stimulation.



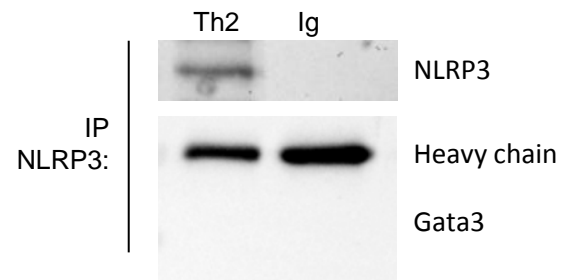
SD7: Western blot analysis of p-STAT5 in EL4 T cell clone stimulated with PMA/Ionomycin or anti-CD3 and anti-CD28 for the indicated time.



SD8: *I/4* and *Ifng* mRNA analysis in WT or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells differentiated in Th1 or Th2 cells for 6 days.

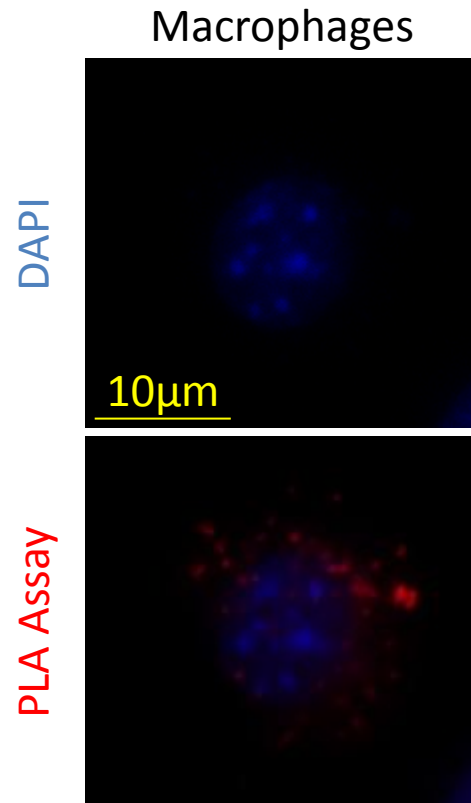


SD9: Analysis of IL-13 and IL-5 expression by Elisa in WT or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells differentiated in Th1 or Th2 cells for 3 or 6 days.

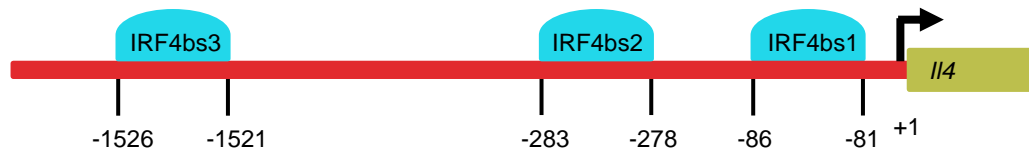


SD10: Western blot analysis of GATA3 after an immunoprecipitation assay with anti-NLRP3 in WT Th2.

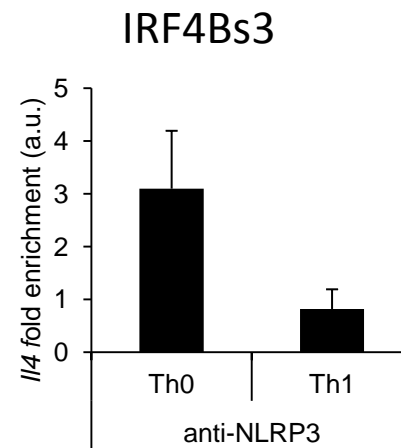




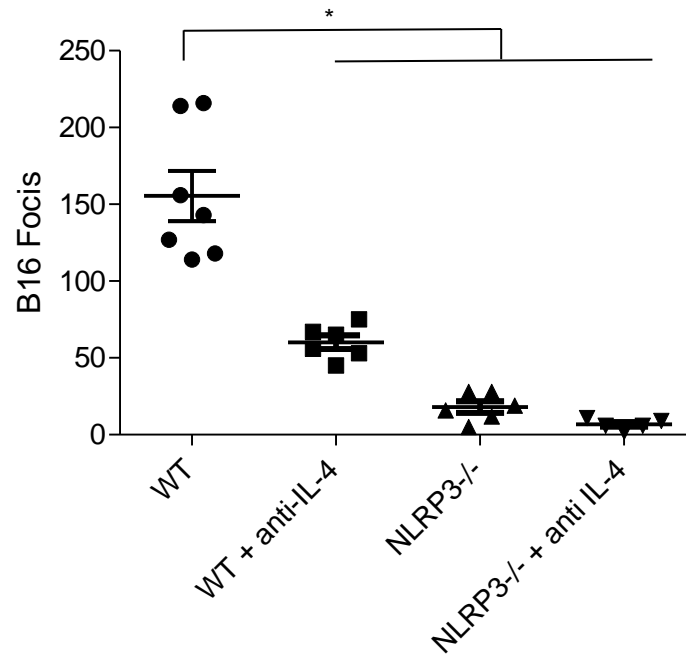
SD11: Proximity ligation assay (PL) between NLRP3 and IRF4 in WT macrophages.



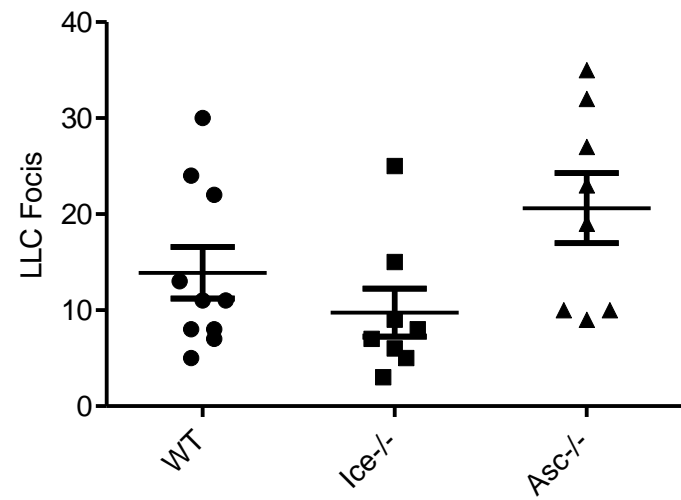
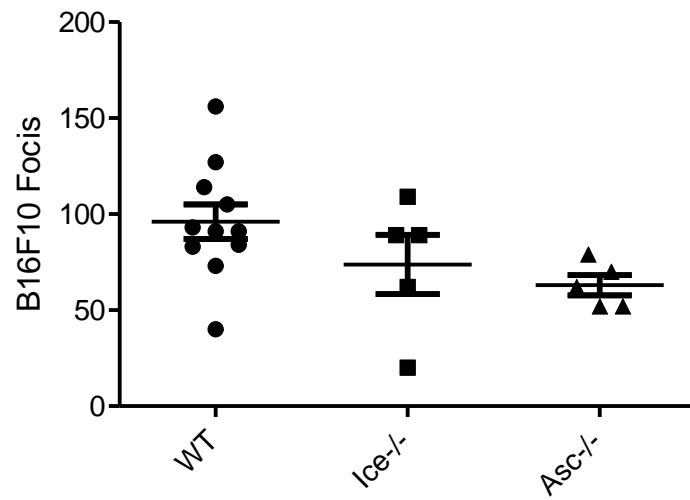
SD12: Putative IRF4 binding sites on *IRF4* promoter found by Bioinformatic analysis



SD13: ChIP assay of NLRP3 binding to the IRF4bs3 of the promoter gene region of *I/4* in wild-type CD4<sup>+</sup> T cells differentiated in Th0 or Th1 cells for one day in presence of anti-CD3 and anti-CD28 mAb and the relevant cytokines



SD14: Number of tumor foci in lung of WT or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice 12 days after intravenous injection of B16F10 cells. Mice were treated with anti-IL-4 at day 4 and 8 after B16F10 injection.



SD15: Number of tumor foci in lung of WT or *Ice-1-* (*caspase-1-/-*) or *Asc-1-* mice injected intravenously with B16F10 or LLC cells, 12 days after tumor cells injection.

#### Annexe 4: Liste des autres publications

« Immune effects of 5-fluorouracil: Ambivalence matters. » Ghiringhelli F, **Bruchard M**, Apetoh L. *Oncoimmunology*. 2013 Mar 1;2(3):e23139.

« Bleomycin exerts ambivalent antitumor immune effect by triggering both immunogenic cell death and proliferation of regulatory T cells. » Bugaut H, **Bruchard M**, Berger H, Derangère V, Odoul L, Euvrard R, Ladoire S, Chalmin F, Végran F, Rébé C, Apetoh L, Ghiringhelli F, Mignot G. *PLoS One*. 2013 Jun 7;8(6):e65181.

« SOCS3 Transactivation by PPAR $\gamma$  Prevents IL-17-Driven Cancer Growth. » Berger H, Végran F, Chikh M, Gilardi F, Ladoire S, Bugaut H, Mignot G, Chalmin F, **Bruchard M**, Derangère V, Chevriaux A, Rébé C, Ryffel B, Pot C, Hichami A, Desvergne B, Ghiringhelli F, Apetoh L. *Cancer Res*. 2013 Jun 15;73(12):3578-3590.

« Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth. » Hervieu A, Rébé C, Végran F, Chalmin F, **Bruchard M**, Vabres P, Apetoh L, Ghiringhelli F, Mignot G. *J Invest Dermatol*. 2013 Feb;133(2):499-508.

« Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. » Ghiringhelli F, **Bruchard M**, Chalmin F, Rébé C. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:473712.

« Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. » Chalmin F, Mignot G, **Bruchard M**, Chevriaux A, Végran F, Hichami A, Ladoire S, Derangère V, Vincent J, Masson D, Robson SC, Eberl G, Pallandre JR, Borg C, Ryffel B, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. *Immunity*. 2012 Mar 23;36(3):362-73.

« Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. » Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Rébé C, Chalmin F, Vincent J, **Bruchard M**, Chauffert B, Martin F, Fumoleau P, Ghiringhelli F. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jan;125(1):65-72.

« 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. » Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, **Bruchard** M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. *Cancer Res.* 2010 Apr 15;70(8):3052-61.

« Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. » Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, **Bruchard** M, Remy-Martin JP, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, De Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin F, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Borg C, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. *J Clin Invest.* 2010 Feb;120(2):457-71.