



ELSEVIER

Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALE

La voie de signalisation de STING dans les lymphocytes T : applications potentielles en immunothérapie anticancéreuse[☆]

STING signaling in T cells: Relevance in cancer immunotherapy

L. Apetoh^{a,b,c,*}

^a Inserm, U1100, Tours, France

^b Faculté de médecine, Université de Tours, Tours, France

^c Laboratoire d'immunologie, CHRU Tours, Tours, France

Reçu le 8 février 2022 ; accepté le 8 février 2022

Disponible sur Internet le 26 juillet 2022

MOTS CLÉS

STING ;
Immunothérapie ;
Cancer ;
Lymphocyte T ;
Différenciation
lymphocytaire T CD4

Résumé Les succès obtenus dans le domaine de l'immunothérapie anticancéreuse grâce aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaire montrent que la capacité des cellules du système immunitaire à éliminer les cellules cancéreuses peut se traduire concrètement dans un contexte clinique. Si cette validation est très encourageante pour les immunologistes, de nombreux patients ne répondent pas aux traitements par les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, ce qui souligne la nécessité d'identifier des stratégies d'immunothérapie alternatives. La protéine STING, initialement caractérisée par l'équipe de Glen Barber comme une molécule essentielle pour la réponse immunitaire antivirale, est devenue une cible thérapeutique d'intérêt en cancérologie dont la pertinence est actuellement évaluée dans des essais cliniques. STING est exprimée dans les différentes sous-populations de cellules immunitaires. S'il est admis que l'activation de STING dans les cellules dendritiques induit des réponses effectrices, l'issue de l'activation de STING dans les lymphocytes T reste moins caractérisée. Bien que des études initiales aient suggéré que l'activation de STING dans les lymphocytes T déclençait leur mort, des études plus récentes ont montré comment STING contribuait au maintien de leurs fonctions effectrices. Nos travaux récents ont révélé également que l'activation intrinsèque de STING modulait la différenciation des lymphocytes T CD4. Dans cette revue générale, nous discuterons les mécanismes moléculaires associés à l'activation de STING dans les lymphocytes T et leurs implications potentielles dans la conception de stratégies d'immunothérapie anticancéreuse.

© 2022 l'Académie nationale de médecine. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

[☆] Journées des 27 et 28 septembre 2021 délocalisées à Tours.

* Auteur correspondant. Inserm U1100, 10, boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France.

Adresse e-mail : lionel.apetoh@inserm.fr

KEYWORDS

STING;
Immunotherapy;
Cancer;
T lymphocyte;
CD4 T cell
differentiation

Summary. – The achievements in cancer immunotherapy thanks to the use of immune checkpoint inhibitors show that harnessing the anticancer activity of immune cells can translate into clinical successes. While these observations urge immunologists to pursue investigations, many patients still do not respond to treatments with immune checkpoint inhibitors, underscoring the need to identify alternate immunotherapy strategies. The STING (Stimulator of Interferon Genes) protein, initially characterized by the group of Glen Barber as a key molecule responsible for antiviral defense, has become an interesting therapeutic target in oncology and its relevance is currently being tested in clinical trials. STING is expressed in different sub-populations of immune cells. While STING activation in dendritic cells triggers effector immune responses, the outcome of STING activation in T cells remains elusive. Although initial studies suggested that engaging STING signaling in T cells triggered cell death, subsequent investigations instead proposed that STING could promote effector T cell functions. Our recent studies also unravel that cell-intrinsic STING signaling in CD4 T cells shapes CD4 T cell differentiation. In this review, we discuss the molecular mechanisms associated with STING activation in T cells and the potential implications for the design of cancer immunotherapy strategies.

© 2022 l'Académie nationale de médecine. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

La description des caractéristiques des cellules cancéreuses a profondément évolué au cours de ces vingt dernières années [1–3]. En effet, depuis la présentation initiale des six caractéristiques des cellules cancéreuses en 2000 par Bob Weinberg et Douglas Hanahan, il a été établi que les cellules cancéreuses possèdent également la capacité à résister à leur élimination par les cellules du système immunitaire [3]. Le concept selon lequel les cellules du système immunitaire sont capables d'éliminer les cellules cancéreuses avant qu'elles ne forment une tumeur cliniquement détectable a été énoncé en 1957 [4]. Il a ensuite été validé non seulement dans le cadre d'études précliniques mais aussi chez l'homme (discuté dans [5,6]). Les infiltrats immunologiques de cellules effectrices comme les T CD8 dans les cancers du côlon ou du sein sont en effet associés à un pronostic clinique favorable [6–8]. L'importance d'un système immunitaire fonctionnel a également été documentée dans le cas de la réponse aux thérapies anticancéreuses. Les équipes des Pr. Zitvogel et Kroemer ont en effet pu montrer que l'induction d'une mort cellulaire immunogène des cellules tumorales provoquée par les thérapies anticancéreuses entraînait une activation du système immunitaire qui était déterminante pour le succès thérapeutique de ces traitements [9–11]. Ainsi, des patientes atteintes de cancer du sein et présentant une mutation perte de fonction du Toll-like récepteur 4 présentaient une survie sans progression réduite après traitement par radiothérapie et anthracyclines [9,12]. L'importance clé des réponses immunitaires anticancéreuses dans le traitement des patients atteints de cancer est également confirmée par l'utilisation en clinique des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire [13,14]. Ces derniers peuvent être exprimés par des cellules immunitaires activées et la signalisation via ces molécules va limiter l'activation cellulaire. En conséquence, des anticorps dirigés par exemple contre la molécule PD-1 vont limiter la dysfonction des cellules T CD8 dans l'environnement tumoral, voire restaurer des réponses immunitaires anticancéreuses [15,16]. Chez l'homme, la préexistence de cellules T CD8 dans l'environnement tumoral avant traitement est associée à une réponse favorable dans le mélanome [17]. La qualité de la réponse T CD4 est aussi essentielle et détermine la réponse clinique dans le cancer du poumon lors du blocage de la voie PD-1/PD-L1 [18]. L'exploitation de cette stratégie thérapeutique en clinique a permis d'obtenir des succès majeurs, ce qui justifie l'utilisation maintenant usuelle de l'immunothérapie dans le mélanome et le cancer

du poumon métastatique (discuté dans [19,20]). Toutefois, plus de la moitié des patients traités ne répondent pas à ces traitements. Par ailleurs, les taux de réponses sont très faibles dans certains autres types de cancers comme ceux du sein et du colon. Ceci souligne la nécessité d'identifier des stratégies thérapeutiques alternatives permettant de mobiliser les réponses immunitaires contre le cancer.

Selon la théorie émise par Polly Matzinger en 1994 [21], la fonction principale du système immunitaire est de détecter les molécules associées à un danger. La méthode de reconnaissance du danger est intrinsèquement liée à la compartimentation cellulaire. Les Toll-like récepteurs 3 et 7 peuvent reconnaître les ARNs viraux dans les endosomes alors que le TLR4 détecte le lipopolysaccharide au niveau de la membrane cellulaire [22]. Cette reconnaissance entraîne une transduction du signal aboutissant à l'activation de la sécrétion des interférons de type I et à l'induction de molécules proinflammatoires. L'équipe de Glen Barber a mis en évidence un autre mode de détection du danger reposant sur la détection des acides nucléiques présents dans le cytosol [23,24]. Cette équipe a initialement mis en évidence que la molécule STING (Stimulator of Interferon Genes) était indispensable pour la sécrétion d'IFN de type I en réponse à de l'ADN viral cytosolique [24]. STING est essentielle pour la défense antivirale et les souris déficientes pour STING infectées par le virus de l'herpès meurent alors que les souris sauvages survivent [24]. D'autres groupes ont confirmé ces résultats et caractérisé les voies moléculaires impliquées. Il a notamment été démontré que la présence d'ADN double-brin dans le cytosol était détectée par la molécule cGAS, ce qui allait entraîner la formation d'un di-nucléotide cyclique, le cGAMP, responsable de l'activation de STING [25,26]. La capacité des ligands de STING à activer la réponse immunitaire a été exploitée en cancérologie. Des études précliniques ont montré que l'activation de STING dans les cellules dendritiques induisait des réponses immunitaires anticancéreuses dépendantes de l'action des cellules T CD8 [27–29]. Des essais cliniques évaluent actuellement la pertinence du ciblage de STING chez l'homme (discuté dans [30]). Cependant, STING est exprimée non seulement dans les cellules du système immunitaire inné mais aussi dans les lymphocytes T, B et NK. Les conséquences physiologiques de l'activation de STING dans ces types cellulaires restent peu caractérisées à ce jour. Dans cette revue, nous discuterons comment l'activation de STING dans les cellules T influence leurs fonctions et quelles sont les conséquences associées en immunothérapie anticancéreuse.

Quelle est la contribution de STING dans la biologie des lymphocytes T ?

STING affecte la prolifération et la viabilité des lymphocytes T

La fonctionnalité de STING dans les lymphocytes T a été étudiée par l'équipe d'Alexander Poltorak [31]. Après avoir montré que l'expression de STING dans les cellules T était très forte, voire supérieure à celle observée dans des cellules myéloïdes, les auteurs ont traité les cellules T avec du DMXAA, petite molécule traversant les membranes cellulaires et ciblant sélectivement la molécule STING chez la souris. Il a été observé dans ce contexte une sécrétion d'interférons de type I [31]. Cette sécrétion est bien dépendante de l'activation de STING car elle n'est pas observée si les cellules T proviennent de souris déficientes pour STING [31]. Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Takashi Saito en utilisant d'autres ligands de STING comme des di-nucléotides cycliques tels que le c-di-AMP et le cGAMP [32]. Ces données suggèrent que la voie de signalisation de STING est fonctionnelle et activable dans les cellules T. En activant les cellules T en présence d'anticorps dirigés contre les molécules CD3 et CD28, les auteurs ont noté que le DMXAA réduisait la prolifération cellulaire T et induisait un programme d'apoptose [31]. Ces résultats ont été confirmés par l'équipe d'Andréa Ablasser en utilisant un autre ligand synthétique de STING, le CMA [33]. En effet, l'exposition des cellules T au CMA entraîne leur apoptose, ce qui est notamment reflété par le clivage de la caspase 3. Par ailleurs, les auteurs ont montré que les cellules T avaient une plus grande sensibilité à la mort induite par ce ligand de STING que les cellules myéloïdes. Des études mécanistiques ont permis de démontrer l'implication des protéines IRF3 et p53 dans ces effets [33]. En utilisant des cellules T de patients porteurs d'une mutation entraînant une activation constitutive de STING, l'équipe de Nicolas Manel a pu montrer que dans les cellules T CD4 humaines l'activation de STING allait limiter leur prolifération mais pas leur mort [34]. Ainsi, si l'activation de STING dans les cellules T est susceptible d'induire leur sécrétion d'interférons de type I, une activation prononcée de cette voie moléculaire peut entraîner un blocage de la prolifération cellulaire, voire la mort de ces cellules.

La sécrétion d'interférons de type I par les lymphocytes T activés par des ligands de STING est susceptible d'affecter leur biologie. Afin de tester si les effets de l'activation de STING sont dépendants de la sécrétion des interférons de type I, l'équipe de Nan Yan a généré des souris chez lesquelles la protéine STING a été modifiée en substituant en position 365 de la protéine une sérine par une alanine [35]. Cette modification empêche en effet le recrutement d'IRF3 consécutif à l'activation de STING ce qui prévient la sécrétion d'interférons de type I. Les auteurs ont ensuite étudié la sensibilité des cellules T à l'induction de la mort induite par des ligands de STING. Une découverte importante est l'implication différentielle de la voie de signalisation des interférons en fonction du ligand de STING utilisé. En effet, les ligands synthétiques tels que le DMXAA et le CMA induisent une mort des cellules T totalement indépendante des interférons alors que le 2'3'cGAMP induit une mort partiellement dépendante d'IRF3. Ceci suggère que l'effet biologique observé sur les cellules T exposées à des ligands de STING va être différent non seulement en fonction du type de ligand utilisé mais aussi du mode d'activation de STING. Est-ce que ces observations ont des

conséquences dans la capacité des cellules T à limiter la progression du cancer ? Pour répondre à cette question, les auteurs ont utilisé un modèle de transfert adoptif de cellules T CD8 dans des souris déficientes en lymphocytes T et B et injectées avec des cellules cancéreuses B16 de mélanome. Dans ce contexte, les auteurs ont observé que les cellules T CD8 déficientes pour STING avaient une meilleure capacité à limiter la progression tumorale chez les animaux par rapport aux souris sauvages [35]. Ces données ont été également obtenues dans le modèle de cancer colorectal MC38. Par ailleurs, en accord avec leurs résultats *in vitro*, les auteurs ont observé que les cellules T CD8 déficientes pour STING de l'environnement tumoral présentaient une bien meilleure viabilité que les cellules T CD8 sauvages. Enfin, quand des souris sauvages ou déficientes pour STING ont été injectées avec des cellules tumorales MC38, les auteurs ont également constaté que les cellules T isolées des tumeurs avaient une meilleure viabilité chez les souris déficientes pour STING. L'utilisation des souris S365A a permis de montrer que ce phénomène est indépendant de la sécrétion des interférons de type I. Ainsi, l'ensemble des travaux présentés suggère que l'activation de STING est susceptible d'entraîner la mort des lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* dans l'environnement tumoral.

STING contribue au maintien des fonctions anticancéreuses des lymphocytes T

Les résultats plus haut suggèrent que l'activation de STING dans les cellules T serait délétère dans une approche d'immunothérapie du cancer. Toutefois, des résultats récents viennent nuancer un lien direct entre STING et abolition des fonctions des cellules T. En effet, l'équipe de Liufu Deng a montré que la voie cGAS-STING est essentielle au maintien de la jeunesse des lymphocytes T et à leurs fonctions anticancéreuses [36]. En isolant des lymphocytes T CD8 et CD4 à partir du sang de patientes atteintes de cancer des ovaires, du col de l'utérus et de l'endomètre, les auteurs ont constaté une expression de STING bien plus faible que dans les lymphocytes de volontaires sains [36]. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que l'expression de STING dans les cellules T pouvait être bénéfique pour leur lutte contre le cancer. Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont utilisé un modèle de transfert adoptif de lymphocytes T CD8 spécifiques contre un antigène tumoral exprimé par des cellules de mélanome B16. Dans ce contexte, les cellules T CD8 sauvages activées par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL-15 et d'IL-7 sont capables de limiter la croissance tumorale de la tumeur. Cependant, l'absence de STING ou de cGAS dans les cellules T CD8 effectrices a annulé ces effets, ce qui indique une contribution majeure de la voie STING pour les effets anticancéreux des cellules T CD8 activées. Afin de valider ces observations, les auteurs ont généré des souris dans lesquelles l'expression de STING est conditionnellement déficiente dans les cellules T. Les auteurs ont noté que dans ces souris la croissance des lignées cancéreuses de lymphome T EG7 et gliome GL261 était freinée par rapport aux souris sauvages [36]. Ceci indique que l'expression endogène de STING dans les cellules T permet de lutter contre la progression du cancer. Les auteurs ont ensuite exploré les mécanismes impliqués dans ces observations. Ils ont constaté que l'absence de STING limite la capacité d'expansion des lymphocytes T transférés chez des souris porteuses de tumeurs. Une expression réduite du marqueur de prolifération Ki67 et une sécrétion plus faible d'IFN-gamma par les cellules T CD8 déficientes pour STING a confirmé son rôle clé dans

le maintien des fonctions des cellules T CD8 transférées in vivo. Il a été établi par de nombreux scientifiques que les cellules T CD8 avancées dans leur processus de différenciation, des cellules effectrices terminales, avaient des capacités plus faibles à limiter la progression cancéreuse in vivo (discuté dans [6]). En accord avec ceci, les auteurs ont vérifié que les cellules T CD8 déficientes pour STING et transférées chez des animaux porteurs de tumeurs présentaient d'avantage un phénotype effecteur mémoire que les cellules T CD8 sauvages. L'examen du niveau d'expression du facteur de transcription TCF-1 permet de déterminer si les cellules T possèdent des caractéristiques de cellules souches ou effectrices terminales [37,38]. Les auteurs ont remarqué que l'expression de TCF-1 était plus faible chez les cellules T CD8 transférées déficientes pour STING. Ainsi, l'activation de STING est nécessaire in vivo pour le maintien des caractéristiques de cellules souches des lymphocytes T CD8 transférés chez des animaux porteurs de tumeurs. L'importance potentielle des interférons de type I a été recherchée. Tout d'abord, les auteurs ont vérifié que les cellules T CD8 activées avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 exprimaient de l'interféron beta de manière dépendante de STING. Existe-il une action autocrine de l'interféron beta sur les cellules T CD8 ? Pour tester ceci, les auteurs ont répété leurs expériences de transfert adoptif en bloquant l'action de l'IFN beta sur les CD8 activés in vitro avec un anticorps dirigé contre le récepteur des interférons de type I. Par ailleurs, après transfert des cellules, les souris porteuses de tumeurs B16 ont également été traitées avec le même anticorps. Les auteurs ont alors observé une abrogation totale de l'activité anticancéreuse des cellules T CD8 transférées. Ils ont aussi fait les mêmes observations qu'avec des cellules T CD8 déficientes pour STING, une moindre prolifération et sécrétion de cytokines effectrices accompagnée d'une plus faible expression de TCF1 [36]. Ainsi, les interférons de type I sont essentiels dans les effets anticancéreux des lymphocytes T CD8 dans le cadre d'un transfert adoptif chez des souris porteuses de tumeurs.

Comment la voie de signalisation de STING contribue-t-elle au maintien des caractéristiques de cellules souches des lymphocytes T CD8 ? Pour tester ceci, les auteurs ont activé avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et en présence d'IL-15 des cellules T CD8 de souris sauvages ou présentant une mutation perte de fonction de STING. Dans ce contexte, les auteurs n'ont pas observé de différences de viabilité entre les cellules T CD8 provenant des deux souches de souris. En mesurant l'expression de Tcf7 (codant pour TCF1), les auteurs ont toutefois constaté que son niveau d'expression dépendait de la présence de STING. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des cellules T CD8 provenant de souris déficientes pour cGAS. Afin de tester si ces résultats étaient liés à l'absence de la sécrétion d'interférons de type I en raison de l'abrogation de la voie cGAS/STING, les auteurs ont ajouté de l'interféron beta sur des cellules T CD8 déficientes pour cGAS et activées comme précédemment. Les auteurs ont alors constaté une restauration de l'expression de Tcf7 démontrant un lien direct entre l'induction de la sécrétion d'IFNs par la voie cGAS/STING et le maintien des caractéristiques de cellules souches des cellules T CD8 [36]. Les auteurs ont ensuite établi que la voie cGAS/STING prévient la sur-activation des cellules T CD8 en limitant la phosphorylation d'Akt, un événement entraînant la dysfonction des cellules T CD8 dans l'environnement tumoral [39,40] (Fig. 1). La pertinence des résultats précédents a ensuite été déterminée chez l'homme. Après avoir isolé des cellules T CD8 naïves de volontaires sains et de patients atteints de cancer, les auteurs ont montré que l'activation de ces cellules en présence d'un ligand de STING

réduit leur acquisition de marqueurs de cellules effectrices. Une observation également très intéressante des auteurs est que l'activation de STING dans ces cellules n'a pas induit de mort cellulaire. Enfin, les auteurs ont montré dans un modèle de xélogreffe que l'activation de cellules CAR T humaines dirigées contre la molécule CD20 en présence de l'agoniste de STING C3 renforçait leurs propriétés antitumorales in vivo [36]. Ceci suggère que les ligands de STING peuvent être exploités dans le cadre de la thérapie cellulaire anticancéreuse.

L'activation de la voie STING dans les lymphocytes T CD4 affecte leur polarisation fonctionnelle

L'importance de la réponse T CD4 pour l'efficacité thérapeutique des ligands de STING avait déjà été suggérée dans la littérature [41]. En effet, l'élimination des cellules T CD4 avec des anticorps neutralisants chez des souris porteuses de cellules cancéreuses mammaires compromet l'efficacité thérapeutique des ligands de STING. Cependant, la qualité de la réponse T CD4 responsable de ces effets antitumoraux était peu claire. Les lymphocytes T CD4 naïfs ont en effet la capacité de se différencier en différents sous-types lymphocytaires effecteurs dont la polarisation fonctionnelle va dicter leurs fonctions in vivo [42]. Nous avons donc étudié les conséquences de l'activation de STING sur la biologie des lymphocytes T CD4. Pour cela, nous avons évalué l'état d'activation des lymphocytes T CD4 après le traitement de souris porteuses de cancer colorectal murin MC38 par du cGAMP injecté dans la tumeur. En accord avec les travaux précédemment discutés, nous avons constaté une induction de l'expression des gènes codant pour les interférons de type I dans les lymphocytes T CD4 des souris traitées par le cGAMP [43]. Nous avons également constaté une induction de l'expression de gènes codant pour des cytokines effectrices des cellules T CD4, notamment l'IFN-gamma et l'IL-9. Nous avons souhaité évaluer directement l'implication de ces cytokines dans la qualité de la réponse anticancéreuse induite par des ligands de STING. Pour cela, nous avons testé l'efficacité thérapeutique du cGAMP chez des souris porteuses de tumeurs et traitées avec des anticorps neutralisants dirigés soit contre l'IFN-gamma, l'IL-4, l'IL-17 ou l'IL-9. Nous avons ainsi observé que le blocage de l'IL-4 ou de l'IL-17 n'avait pas de conséquences majeures sur les effets anticancéreux de l'injection de cGAMP. Cependant, en l'absence d'IFN-gamma le cGAMP avait une action anticancéreuse nettement diminuée. L'action optimale du cGAMP dépendait aussi de l'IL-9 car la neutralisation de l'IL-9 a réduit son efficacité thérapeutique. Des expériences réalisées dans le modèle de mélanome murin B16F10 avaient permis de confirmer le rôle important des cytokines effectrices IFN-gamma et IL-9 dans l'activité anticancéreuse du cGAMP [43]. Nous avons pu confirmer que l'injection de cGAMP entraînait la sécrétion d'IFN-gamma et d'IL-9 par les lymphocytes T CD4 infiltrant les tumeurs. Ainsi, si les lymphocytes T CD8 restent indispensables dans le cadre des réponses immunitaires antitumorales médiées par l'activation de STING, nos résultats soulignent une contribution essentielle des réponses effectrices T CD4 aux effets anticancéreux des ligands de STING.

Nos résultats obtenus in vivo suggéraient que les ligands de STING étaient susceptibles de renforcer la différenciation de deux sous-types lymphocytaires aux propriétés anticancéreuses reconnues, les lymphocytes T_H1 et T_H9 [44–47]. Pour tester cela, nous avons différencié des cellules T

Cellule T CD8

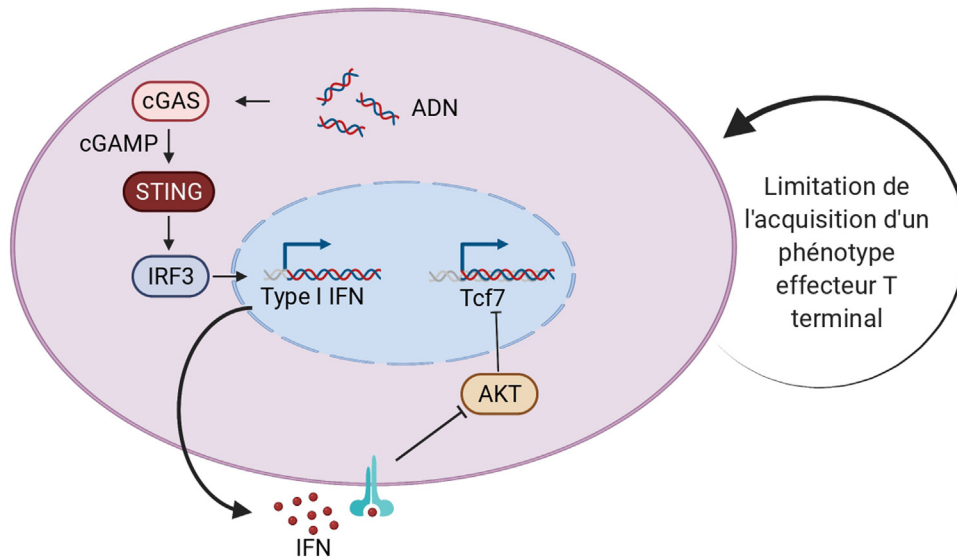


Figure 1 L'activation de STING dans les cellules T CD8 permet de limiter leur acquisition d'un phénotype de cellules effectrices terminales (adapté d'après [36]).

CD4 naïves en cellules T_H1 ou T_H9 en présence ou non de ligands de STING. Nous avons constaté que le cGAMP est bien capable de renforcer les polarisations T_H1 et T_H9 , ce qui est vérifié par l'augmentation de la sécrétion respective d'IFN-gamma et d'IL-9 de ces cellules. Des résultats similaires ont été obtenus avec de faibles doses de DMXAA. En accord avec les travaux précédemment discutés dans la partie 2, de fortes doses de cGAMP ou de DMXAA induisent la mort des lymphocytes T CD4. Les travaux de Zhao et ses collaborateurs avaient suggéré que l'absence de STING entraînait un renforcement de la sécrétion d'IL-17A par les cellules T_H17 et que l'activation de STING avec du DMXAA avait un effet inverse [48]. En examinant l'effet du cGAMP sur la différenciation cellulaire T_H17 , nous n'avons toutefois pas observé d'effet marqué de la signalisation de STING sur ces cellules. Il est possible que des modes d'activation différent de STING entre les deux études soient responsables de ces observations discordantes.

Nous avons ensuite étudié les voies moléculaires activées dans les cellules T CD4 traitées par des ligands de STING. Nous avons constaté une activation de la voie de signalisation de STING, ce qui était notamment reflété par la phosphorylation de la protéine IRF3 et l'induction de l'expression de gènes codant pour des protéines inflammatoires comme le TNF-alpha [43]. L'induction de l'expression d'IRF3 suggérait une sécrétion potentielle d'interférons de type I par les cellules T CD4 activées. Nous avons en effet vérifié que les cellules T_H1 et T_H9 différenciées en présence de ligands de STING sécrétaient des interférons de type I induite par l'activation de STING à la différenciation des cellules T_H1 et T_H9 ? Pour répondre à cette question, nous avons différencié in vitro des cellules T CD4 naïves de souris déficientes pour IRF3 en cellules T_H1 ou T_H9 en présence ou non de cGAMP. Comme il a été précédemment décrit dans la littérature que les interférons de type I pouvaient favoriser la différenciation cellulaire T_H9 [49], nous avons supposé que l'absence d'IRF3 allait compromettre les effets du cGAMP. Ceci n'a pourtant pas été vérifié. Les résultats obtenus ont montré que la présence d'IRF3 était

requis pour les effets du cGAMP sur les cellules T_H1 , mais pas sur les cellules T_H9 [43] (Fig. 2). Il a été décrit que la voie de signalisation de NF- κ B était impliquée dans la sécrétion d'IL-9 par les cellules T_H9 [50]. Nous avons alors émis l'hypothèse que la capacité du cGAMP à renforcer la différenciation cellulaire T_H9 était dépendante de l'activation d'NF- κ B. Pour tester cela, nous avons généré des souris déficientes conditionnellement pour la sous-unité p65 d'NF- κ B dans les cellules T, puis nous avons différencié les cellules T CD4 naïves de ces souris en cellules T_H9 en présence ou non de cGAMP. Contrairement à nos attentes, l'absence de la sous-unité p65 n'a cependant pas bloqué de manière marquée l'effet du cGAMP [43]. La voie de signalisation de mTOR est importante pour la différenciation cellulaire T_H9 [51]. Comme l'activation de mTOR dans les lymphocytes T détermine leur induction d'IFN de type I après stimulation de STING [32], nous avons testé si cette voie moléculaire est impliquée dans le renforcement de la sécrétion d'IL-9 par les cellules T_H9 activées avec du cGAMP. Le blocage de la voie mTOR avec de la rapamycine a abrogé les effets du cGAMP sur les cellules T_H9 [43]. Ainsi, si l'activation de STING augmente les différenciations des cellules T_H1 et T_H9 , les mécanismes impliqués sont distincts. La voie des interférons de type I est responsable du renforcement de la polarisation T_H1 par les ligands de STING alors que dans le cas de la différenciation cellulaire T_H9 la voie moléculaire impliquée est mTOR (Fig. 2 et Fig. 3).

Nous avons précédemment identifié les fonctions anticancéreuses marquées des cellules T_H9 dans le cadre d'un transfert adoptif chez des souris porteuses de mélanome [43,45–47]. Nous avons donc testé l'intérêt de différencier les cellules T_H9 en présence de cGAMP pour renforcer leur activité anticancéreuse. Nous avons en effet constaté une activité thérapeutique accrue de ces cellules chez des souris porteuses de mélanome sous-cutané. Ces données ont été confirmées dans un modèle permettant de déterminer le nombre de foyers tumoraux pulmonaires avec des cellules tumorales B16 injectées en intraveineuse [43]. Ainsi, le cGAMP confère des propriétés anticancéreuses accrues aux cellules T_H9 dans un modèle de transfert adoptif. Nous avons

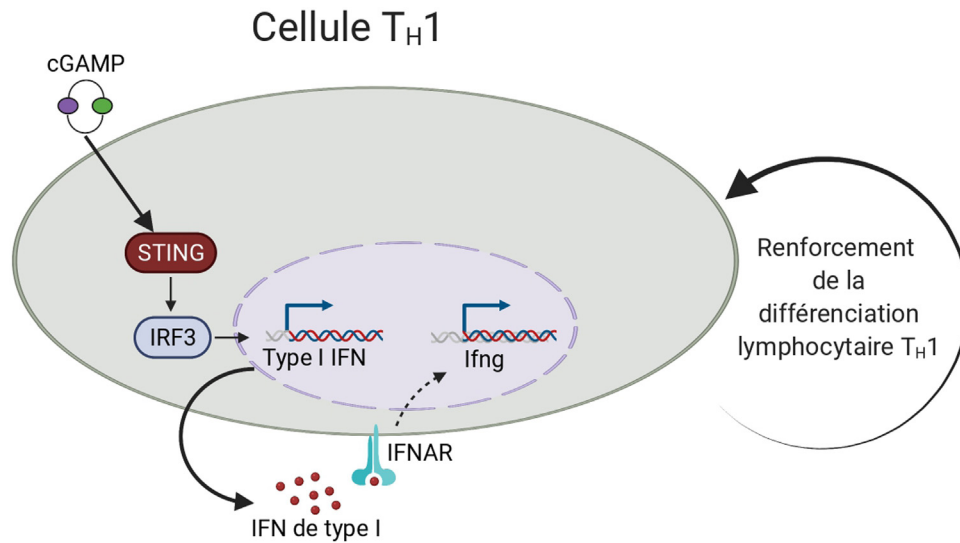


Figure 2 L'activation de STING par le cGAMP renforce la différenciation cellulaire T_H1 (d'après [43,52]).

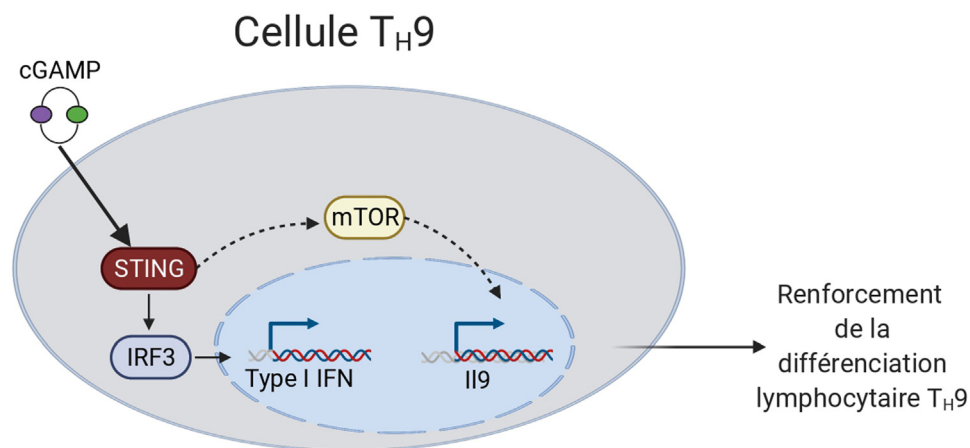


Figure 3 L'activation de STING par le cGAMP renforce la différenciation cellulaire T_H9 (d'après [43,52]).

finalement testé si une stratégie similaire pouvait potentiellement être applicable dans un contexte clinique. Pour cela, nous avons isolé des cellules T CD4 naïves du sang de volontaires sains et différencié ces cellules en T_H9 en présence de cGAMP ou non. Nous avons constaté comme chez la souris que l'addition de cGAMP augmentait fortement la sécrétion d'IL-9 par les cellules T_H9 humaines, ce qui suggère que les résultats murins sont potentiellement transférables chez l'homme.

Conclusions

Les données initialement obtenues avec des ligands synthétiques indiquent clairement qu'une forte activation de STING dans les lymphocytes T entraîne leur mort. Cependant, les données récentes de la littérature suggèrent qu'il est possible de moduler la force du signal provoqué par l'activation de STING dans les lymphocytes T dans un but thérapeutique. Si le ciblage sélectif des cellules T par les ligands de STING in vivo est complexe (discuté dans [30]), des stratégies visant à moduler les réponses T in vitro pour les exploiter dans un contexte de transfert adoptif ont déjà

été mises en œuvre avec succès. En effet, nos travaux ainsi que ceux d'autres groupes soulignent l'importance de la présence de STING dans les cellules T pour leur efficacité en thérapie cellulaire anticancéreuse [36,43,52,53]. Les données de Xu et al. montrent en outre que les ligands de STING renforcent l'activité anticancéreuse des cellules T à récepteur antigénique chimérique en combinaison avec une inhibition des cellules myéloïdes immunosuppressives et un anticorps anti-PD-1 [53]. Ces résultats suggèrent dans leur ensemble que l'activation des cellules T par des ligands de STING pourrait être utilisée dans le cadre de stratégies de thérapie cellulaire anticancéreuse.

Déclaration de liens d'intérêts

L.A. Interventions ponctuelles : activités de conseil pour Roche, Merck, Bristol-Myers Squibb et Orega-Biotech.

L.A. Travaux de recherches : financement de travaux de recherches non liés à ceux décrits dans cet article par l'entreprise Sanofi.

Remerciements

L'auteur remercie la Fondation de France, le Conseil Régional de Bourgogne, le FEDER, l'Agence Nationale de la Recherche [ANR-11-LABX-0021 et ANR-10-LABX-0053] et le Conseil Européen de la Recherche (projet 677251) pour le financement des travaux décrits [43].

Références

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
- [3] Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* 2022;12(1):31–46.
- [4] Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1957;1(5022):779–86.
- [5] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoeediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329–60.
- [6] Apetoh L, Smyth MJ, Drake CG, Abastado JP, Apte RN, Ayyoub M, et al. Consensus nomenclature for CD8(+) T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology* 2015;4(4) [e998538].
- [7] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Page C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313(5795):1960–4.
- [8] Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(15):1949–55.
- [9] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13(9):1050–9.
- [10] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13(1):54–61.
- [11] Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009;15(10):1170–8.
- [12] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007;220:47–59.
- [13] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252–64.
- [14] Dosset M, Joseph EL, Rivera Vargas T, Apetoh L. Modulation of determinant factors to improve therapeutic combinations with immune checkpoint inhibitors. *Cells* 2020;9(7).
- [15] Dosset M, Vargas TR, Lagrange A, Boidot R, Vegran F, Roussey A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: an adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2018;7(6) [e1433981].
- [16] Rivera Vargas T, Apetoh L. Can immunogenic chemotherapies relieve cancer cell resistance to immune checkpoint inhibitors? *Front Immunol* 2019;10:1181.
- [17] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515(7528):568–71.
- [18] Zuazo M, Arasanz H, Fernandez-Hinojal G, Garcia-Granda MJ, Gato M, Bocanegra A, et al. Functional systemic CD4 immunity is required for clinical responses to PD-L1/PD-1 blockade therapy. *EMBO Mol Med* 2019;11(7) [e10293].
- [19] Curti BD, Faries MB. Recent advances in the treatment of melanoma. *N Engl J Med* 2021;384(23):2229–40.
- [20] Genova C, Dellepiane C, Carrega P, Sommariva S, Ferlazzo G, Pronzato P, et al. Therapeutic implications of tumor microenvironment in lung cancer: focus on immune checkpoint blockade. *Front Immunol* 2021;12:799455.
- [21] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991–1045.
- [22] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011;34(5):637–50.
- [23] Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 2008;455(7213):674–8.
- [24] Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009;461(7265):788–92.
- [25] Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013;339(6121):826–30.
- [26] Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 2013;339(6121):786–91.
- [27] Rivera Vargas T, Benoit-Lizon I, Apetoh L. Rationale for stimulator of interferon genes-targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2017;75:86–97.
- [28] Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leung MY, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* 2014;41(5):830–42.
- [29] Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors. *Immunity* 2014;41(5):843–52.
- [30] Garland KM, Sheehy TL, Wilson JT. Chemical and biomolecular strategies for STING pathway activation in cancer immunotherapy. *Chem Rev* 2022.
- [31] Larkin B, Ilyukha V, Sorokin M, Buzdin A, Vannier E, Poltorak A. Cutting edge: activation of STING in T cells induces type I IFN responses and cell death. *J Immunol* 2017;199(2):397–402.
- [32] Imanishi T, Unno M, Kobayashi W, Yoneda N, Matsuda S, Ikeda K, et al. Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function. *Life Sci Alliance* 2019;2(1).
- [33] Gulen MF, Koch U, Haag SM, Schuler F, Apetoh L, Villunger A, et al. Signalling strength determines proapoptotic functions of STING. *Nat Commun* 2017;8(1):427.
- [34] Cerboni S, Jeremiah N, Gentili M, Gehrmann U, Conrad C, Stolzenberg MC, et al. Intrinsic antiproliferative activity of the innate sensor STING in T lymphocytes. *J Exp Med* 2017;214(6):1769–85.
- [35] Wu J, Dobbs N, Yang K, Yan N. Interferon-independent activities of mammalian STING mediate antiviral response and tumor immune evasion. *Immunity* 2020;53(1) [115-26 e5].
- [36] Li W, Lu L, Lu J, Wang X, Yang C, Jin J, et al. cGAS-STING-mediated DNA sensing maintains CD8(+) T cell stemness and promotes antitumor T cell therapy. *Sci Transl Med* 2020;12(549).
- [37] Miller BC, Sen DR, Al Aboosy R, Bi K, Virkud YV, LaFleur MW, et al. Subsets of exhausted CD8(+) T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol* 2019;20(3):326–36.
- [38] Danilo M, Chennupati V, Silva JG, Siegert S, Held W. Suppression of Tcf1 by Inflammatory Cytokines Facilitates Effector CD8T Cell Differentiation. *Cell Rep* 2018;22(8):2107–17.
- [39] Crompton JG, Sukumar M, Roychoudhuri R, Clever D, Gros A, Eil RL, et al. Akt inhibition enhances expansion of potent tumor-

- specific lymphocytes with memory cell characteristics. *Cancer Res* 2015;75(2):296–305.
- [40] Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, et al. The tumor microenvironment represses T cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral T cell metabolic insufficiency and dysfunction. *Immunity* 2016;45(2):374–88.
- [41] Foote JB, Kok M, Leatherman JM, Armstrong TD, Marcinkowski BC, Ojalvo LS, et al. A STING Agonist Given with OX40 Receptor and PD-L1 Modulators Primes Immunity and Reduces Tumor Growth in Tolerized Mice. *Cancer Immunol Res* 2017;5(6):468–79.
- [42] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348–57.
- [43] Benoit-Lizon I, Jacquin E, Rivera Vargas T, Richard C, Roussey A, Dal Zuffo L, et al. CD4 T cell-intrinsic STING signaling controls the differentiation and effector functions of TH1 and TH9 cells. *J Immunother Cancer* 2022;10(1).
- [44] Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 2008;358(25):2698–703.
- [45] Rivera Vargas T, Cai Z, Shen Y, Dosset M, Benoit-Lizon I, Martin T, et al. Selective degradation of PU.1 during autophagy represses the differentiation and antitumour activity of TH9 cells. *Nat Commun* 2017;8(1):559.
- [46] Vegran F, Berger H, Boidot R, Mignot G, Bruchard M, Dosset M, et al. The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat Immunol* 2014;15(8):758–66.
- [47] Rivera Vargas T, Humblin E, Vegran F, Ghiringhelli F, Ape-toh L. TH9 cells in anti-tumor immunity. *Semin Immunopathol* 2017;39(1):39–46.
- [48] Zhao Q, Manohar M, Wei Y, Pandol SJ, Habtezion A. STING signalling protects against chronic pancreatitis by modulating Th17 response. *Gut* 2019;68(10):1827–37.
- [49] Wong MT, Ye JJ, Alonso MN, Landrigan A, Cheung RK, Engleman E, et al. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunol Cell Biol* 2010;88(6):624–31.
- [50] Jash A, Sahoo A, Kim GC, Chae CS, Hwang JS, Kim JE, et al. Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J Biol Chem* 2012;287(19):15445–57.
- [51] Wang Y, Bi Y, Chen X, Li C, Li Y, Zhang Z, et al. Histone Deacetylase SIRT1 Negatively Regulates the Differentiation of Interleukin-9-Producing CD4(+) T Cells. *Immunity* 2016;44(6):1337–49.
- [52] Benoit-Lizon I. Etude du rôle de STING dans la biologie des lymphocytes T CD4: applications en immunothérapie anti-cancéreuse [thèse]. Dijon: université de Bourgogne Franche-Comté 2021:1–125.
- [53] Xu N, Palmer DC, Robeson AC, Shou P, Bommiasamy H, Laurie SJ, et al. STING agonist promotes CAR T cell trafficking and persistence in breast cancer. *J Exp Med* 2021;218(2).