

Université de Montréal

Rôle de CD73 dans la fonction et la transformation des lymphocytes B ainsi que dans le métabolisme cellulaire

Par

David Allard

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en sciences pharmaceutiques, Option pharmacologie

AOÛT 2021

© David Allard

Université de Montréal
Faculté de Pharmacie

Cette thèse intitulée

**Rôle de CD73 dans la fonction et la transformation des lymphocytes B ainsi que dans le
métabolisme cellulaire**

Présentée par
David Allard

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Simon-Pierre Gravel
Président-rapporteur

John Stagg
Directeur de recherche

Marc Servant
Membre du jury

Yan Burelle
Examineur externe

Résumé

L'axe adénoenergique est au cœur de divers processus pathophysiologiques. L'enzyme CD73 joue un rôle pivot dans la génération de l'adénosine en catalysant la déphosphorylation de l'adénosine monophosphate. L'adénosine contribue à un éventail large de processus biologiques et pathologiques, principalement via l'activation de récepteurs transmembranaires. L'adénosine est principalement reconnue pour son activité régulatrice des cellules immunitaires et CD73 pour son rôle dans l'accumulation de l'adénosine dans le microenvironnement tumoral. En effet, en altérant la réponse immunitaire anti-tumorale via l'inhibition des fonctions effectrices de divers types de cellules immunes, CD73 et l'adénosine sont fréquemment associés à la progression tumorale et s'inscrivent comme cibles thérapeutiques intéressantes.

Les rôles de CD73 et l'adénosine dans d'autres processus immunitaires physiologiques ne sont pas tous aussi bien compris, notamment concernant les processus d'immunisations. En utilisant un modèle murin d'immunisation contre le pneumocoque, cette thèse démontre un rôle positif, mais non essentiel, de CD73 et de l'adénosine dans la commutation isotypique des lymphocytes B et la génération d'une immunité protectrice contre l'infection au *S. pneumoniae*. Cette découverte est pertinente au développement de stratégies thérapeutiques afin d'augmenter l'efficacité d'immunisation dépendante des cellules B, plus particulièrement chez les populations à risque en bas âge.

Ensuite, alors que la modulation de l'axe adénoenergique, notamment via l'inhibition de CD73, est une avenue thérapeutique étudiée dans divers contextes de tumeurs solides, ce potentiel thérapeutique demeure largement inexploré dans des modèles de néoplasmes sanguins. En utilisant un modèle de souris transgénique de leucémie spontanée, cette thèse démontre un rôle pro-tumorigénique, avec un biais sexuel, de CD73 dans la leucémie lymphoïde chronique des lymphocytes B (LLC), via l'altération de l'immunité anti-tumorale.

Enfin, alors que les rôles immunosuppresseifs de CD73 et l'adénosine sont bien décrits, leurs activités pro-tumorigéniques qui s'étendent au-delà de l'immunité anti-tumorale sont peu connues. En accord avec la littérature, cette thèse explore plusieurs hypothèses selon lesquelles

CD73 module l'activité métabolique mitochondriale des cellules cancéreuses. Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent un rôle pro-tumorigénique à l'enzyme CD73, indépendant de la signalisation adénoenergique et de l'inhibition de l'immunité anti-tumorale, qui favorise la flexibilité métabolique et plus particulièrement la respiration mitochondriale des cellules cancéreuses, via la voie de récupération de la biosynthèse du nicotinamide (NAD⁺).

En résumé, cette thèse apporte plusieurs précisions quant aux rôles biologiques de l'enzyme CD73 qui sont pertinents à l'immunisation dépendante des lymphocytes B, à la pathogénèse de la LLC ainsi qu'à la régulation de l'activité métabolique des cellules cancéreuses. Cette thèse offre de nouvelles pistes de réflexion quant au potentiel thérapeutique que renferme l'axe adénoenergique et plus particulièrement CD73, en approfondissant nos connaissances quant à l'éventail de ses fonctions.

Mots-clés : CD73, adénosine, immunisation, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), lymphocytes B, leucémie lymphoïde chronique (LLC), immunité anti-tumorale, métabolisme cellulaire cancéreux, respiration mitochondriale, nicotinamide.

Abstract

The adenosinergic axis is central to a plethora of pathophysiological processes. The enzyme CD73 is key to the generation of adenosine by catalyzing the dephosphorylation of adenosine monophosphate. Adenosine's contribution to biological and pathological processes is mainly carried through the activation of transmembrane receptors. Adenosine is mostly appreciated for its regulatory activity on a variety of immune cells whereas CD73 is often referred to the enzyme responsible for adenosine accumulation within tumor microenvironment. Thus, by hindering antitumoral immune responses, CD73 and adenosine are frequently associated with cancer progression and targeting these offers great therapeutic potential in clinic.

CD73 and adenosine's role in other immune physiological processes are not fully understood, notably regarding immunization processes. Using a murine model of pneumococcal immunization, this thesis herein demonstrates a positive, but non-essential, role for CD73 and adenosine in B cells' isotype class switching required to protective immunity against *S. pneumoniae*. This finding is particularly relevant to the development of novel strategies aimed at enhancing B cell-dependent immunization in high-risk populations such as young infants.

While targeting the adenosinergic axis, particularly CD73, was extensively proven efficient in restoring antitumor immunity in many solid tumor contexts, its therapeutic potential in blood neoplastic malignancies remain largely unexplored. Using a transgenic mouse model of spontaneous leukemia, this thesis identifies a sex-oriented pro-tumorigenic role for CD73 in favoring B cells chronic lymphocytic leukemia (CLL) progression, through the inhibition of antitumor immunity.

Finally, while immunosuppression by CD73 and adenosine is well described in cancer, other immune-independent pro-tumorigenic roles of CD73 are poorly understood. In accordance with literature, this thesis explores various hypotheses by which CD73 regulates cancer cells' mitochondrial metabolic activity. Results presented herein suggest an immune- and adenosine signaling-independent pro-tumorigenic function for CD73 in favoring cancer cells' metabolic

flexibility and more particularly mitochondrial respiration through the nicotinamide (NAD⁺) salvage biosynthesis pathway.

In sum, this thesis brings many insights into CD73's biological functions relevant to B cells-dependent immunization, in CLL pathogenesis and in cancer cells' metabolic activity. By expanding our knowledge of the extend of CD73's biological functions, this thesis further discusses novel potential therapeutic opportunities.

Keywords: CD73, adenosine, immunization, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), B cells, chronic lymphocytic leukemia (CLL), antitumor immunity, cancer cells' metabolism, mitochondrial respiration, nicotinamide.

Table des matières

Résumé	1
Abstract	3
Table des matières	5
Liste des figures	13
Liste des tableaux	17
Liste des abréviations	18
Remerciements	24
Avant-propos	26
Chapitre 1 – Introduction	28
1.1 L’axe adénoenergique	28
1.1.1 Présentation des acteurs de l’axe adénoenergique	28
1.1.1.1 Nucléotidases, phosphatases et kinases	29
1.1.1.2 Voie alternative de production d’adénosine	29
1.1.1.3 Signalisation purinergique	31
1.1.1.4 Recyclage intracellulaire et dégradation de l’adénosine	31
1.1.2 Adénosine	32
1.1.2.1 L’adénosine dans les processus physiologiques et pathologiques	32
1.1.2.2 L’adénosine dans le microenvironnement tumoral	33
1.1.3 Récepteurs à l’adénosine	34
1.1.3.1 Les récepteurs A1 et A3	35
1.1.3.2 Les récepteurs A2	35
1.1.3.3 Rôle des récepteurs A2 dans le système immunitaire	37
1.1.3.4 Rôle des récepteurs A2 sur les cellules cancéreuses	40
1.1.3.5 Rôle des récepteurs A2 dans l’environnement tumoral	41
1.1.3.6 Les récepteurs A2 comme cibles thérapeutiques	42
1.1.4 CD73	43
1.1.4.1 Régulation de l’expression de CD73	44
1.1.4.2 Rôle de CD73 dans l’immunité anti-tumorale	45
1.1.4.3 Rôle de CD73 sur les cellules T régulatrices	46

1.1.4.4	Rôle de CD73 sur les cellules cancéreuses	46
1.1.4.5	Rôle de CD73 dans la transformation mésenchymateuse et les cellules souches	47
1.1.4.6	Fonctions indépendantes de l'adénosine et signalisation intracellulaire	48
1.1.4.7	CD73 comme cible thérapeutique	48
1.1.5	CD39 et CD38	49
1.1.5.1	Structure et régulation de l'expression de CD39 et CD38	49
1.1.5.2	Rôle de CD39 dans l'immunité anti-tumorale et le cancer	50
1.1.5.3	Rôle de CD38 dans l'immunité anti-tumorale et le cancer	51
1.1.5.4	La production d'adénosine via les vésicules extracellulaires	51
1.1.5.5	CD39 et CD38 comme cibles thérapeutiques.....	52
1.1.6	Valeur pronostique des composantes de l'axe adénoenergique en cancer...52	
1.1.6.1	Valeur pronostique des récepteurs à l'adénosine	53
1.1.6.2	Valeur pronostique de CD73, CD38 et CD39	53
1.1.7	Synthèse du chapitre	54
1.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	57
1.2.1	Pathophysiologie	57
1.2.1.1	Pneumonie	58
1.2.1.2	Bactériémie	58
1.2.1.3	Méningite	58
1.2.1.4	Résistance aux antibiotiques	59
1.2.2	Immunisation contre <i>S. pneumoniae</i>	59
1.2.2.1	Vaccins à polysaccharides	60
1.2.2.2	Vaccins conjugués	60
1.2.2.3	Programme de vaccination contre le pneumocoque	61
1.2.3	Mécanismes d'immunisation contre <i>S. pneumoniae</i>	61
1.2.3.1	Lymphocytes B-1	62
1.2.3.2	Immunisation dépendante des lymphocytes T	63
1.2.3.3	L'axe adénoenergique et la commutation isotypique	63
1.2.4	Synthèse du chapitre	64

1.3 La leucémie lymphoïde chronique	65
1.3.1 Pathophysiologie	66
1.3.1.1 Diagnostic	66
1.3.1.2 Présentation phénotypique	67
1.3.1.3 Composantes moléculaires, sériques et cytogénétiques	67
1.3.1.4 Syndrome de Richter	69
1.3.2 Classification de la LLC	69
1.3.2.1 Système Rai et Binet	70
1.3.3 Prise en charge thérapeutique	70
1.3.3.1 Évaluation de la réponse clinique	71
1.3.3.2 Chimiothérapie	72
1.3.3.3 Anticorps monoclonaux	72
1.3.3.4 Inhibiteurs de tyrosine kinases	73
1.3.3.5 Inhibiteurs de protéines anti-apoptotiques	74
1.3.3.6 Allogreffe de moelle osseuse	75
1.3.3.7 Combinaisons thérapeutiques de première et seconde ligne	75
1.3.4 Composantes immunologiques et immunothérapies	76
1.3.4.1 Inhibiteurs de points de contrôle immunologique	77
1.3.4.2 Cellules T à récepteur antigénique chimériques (CAR T)	77
1.3.5 L'axe adénosinergique	78
1.3.5.1 CD73	78
1.3.5.2 CD39	79
1.3.5.3 Adénosine désaminase et transporteurs de nucléosides	79
1.3.5.4 Récepteur A2a	80
1.3.5.5 Hypoxie et adénosine	81
1.3.6 Modèle murins de LLC	82
1.3.7 Synthèse du chapitre	83
1.4 Le métabolisme des cellules cancéreuses	84
1.4.1 Métabolisme du glucose et de la glutamine	85
1.4.1.1 Glycolyse	85
1.4.1.2 Glutaminolyse	86

1.4.1.3 Cycle de Krebs	87
1.4.2 Respiration mitochondriale	88
1.4.2.1 Les réactions d'oxydoréduction	89
1.4.2.2 Les navettes mitochondriales	89
1.4.2.3 La ETC et la phosphorylation oxydative.....	90
1.4.2.4 La phosphorylation oxydative, l'aspartate et la prolifération cellulaire	91
1.4.2.5 La phosphorylation oxydative et les fonctions pro-tumorigéniques de cellules cancéreuses	92
1.4.3 Le nicotinamide dinucléotide	93
1.4.3.1 Voies de synthèses du NAD ⁺	93
1.4.3.2 CD73 et le recyclage extracellulaire du NAD ⁺	95
1.4.3.2 Compartimentation du NAD ⁺ intracellulaire	96
1.4.4 Le métabolisme cellulaire et les thérapies anti-cancéreuses	97
1.4.4.1 Inhibiteurs de la glycolyse et de la glutaminolyse	97
1.4.4.2 Le metformin et l'inhibition du complexe I de la chaîne de transport d'électron.....	98
1.4.4.3 Inhibiteurs de la ETC et de la phosphorylation oxydative	99
1.4.4.4 Inhibiteurs des PARPs	99
1.4.5 L'axe adénoenergique et le métabolisme cellulaire	100
1.4.5.1 La signalisation adénoenergique et le facteur de transcription PGC1 α	100
1.4.5.2 L'axe adénoenergique et le métabolisme des cellules cancéreuses	100
1.4.5.3 L'adénosine et le métabolisme des cellules immunitaires	101
1.4.6 Synthèse du chapitre	101
Chapitre 2 – Hypothèses, objectifs et présentation des projets	103
2.1 CD73-A2a et la vaccination à polysaccharides contre <i>S. pneumoniae</i>	103
2.1.1 Hypothèses et objectifs	103
2.1.2 Présentation du 1 ^{er} article	104
2.2 CD73 dans la leucémie lymphoïde chronique	105

2.2.1 Hypothèses et objectifs	105
2.2.2 Présentation du 2 ^e article	105
2.3 CD73 dans le métabolisme mitochondrial des cellules cancéreuses	107
2.3.1 Hypothèses et objectifs	107
2.3.2 Présentation du 3 ^e article	108
Chapitre 3 – CD73-A2a adenosine receptor axis promotes innate B cell antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccination	109
3.1 Résumé	109
3.2 Abstract	110
3.3 Introduction	110
3.4 Material and methods	112
3.5 Results	115
3.5.1 CD73 defines specific subsets of naïve and isotype-switched innate type B cells	115
3.5.2 Normal B cell development and steady state antibody levels in CD73KO mice	116
3.5.3 Delayed IgM to IgG3 isotype switching but comparable susceptibility to <i>S. pneumoniae</i> challenge in CD73KO mice following Pneumovax 23 vaccination	119
3.5.4 IgG3 delay following Pneumovax 23 vaccination in A2aR KO mice	120
3.5.5 Administration of an A2a agonist enhances anti-PPS3 IgG3 Ab response in Pneumovax 23 vaccinated young mice and improves survival following <i>S. pneumoniae</i> challenge	121
3.6 Discussion	123
3.7 Acknowledgments	125
3.8 References	126
3.9 Supplementary figures	128
3.10 Résultats connexes	131
Chapitre 4 – CD73 promotes chronic lymphocytic leukemia in mice	132
4.1 Résumé	132
4.2 Abstract	133

4.3 Introduction	133
4.4 Material and Methods	135
4.5 Results	137
4.5.1 CD73 and CD39 expression is upregulated on non-leukemic lymphocytes upon disease progression	137
4.5.2 CD73-deficiency prolongs survival of E μ -TCL1 male mice in an IFN- γ -dependent manner	138
4.5.3 Sex-dependent hormone production ablation does not influence survival of E μ -TCL1 model	140
4.5.4 CD73 expression on leukemic cells is associated with worse prognosis in CLL patients	140
4.6 Discussion	142
4.7 Acknowledgments	145
4.8 References	146
4.9 Supplementary figures	149
4.10 Résultats connexes	154
Chapitre 5 – CD73 promotes cellular metabolic fitness independently of adenosine signaling	155
5.1 Résumé.....	155
5.2 Abstract	156
5.3 Introduction	157
5.4 Material and Methods	159
5.5 Results	165
5.5.1 CD73 favors tumor growth independently of its immunosuppressive function	165
5.5.2 CD73 enhances intracellular aspartate synthesis to fuel tumor growth	166
5.5.3 CD73 regulates metabolic fitness of cancer cells in an adenosine-independent manner	169
5.5.4 CD73 enhances mitochondrial respiration, but not mitochondrial biogenesis	172
5.5.5 CD73 contributes to cancer cells' metabolism through NAD ⁺ salvage pathway	174

5.5.6 CD73-deficiency sensitizes cancer cells to DNA-damaging agents in a PARP-dependent manner	175
5.6 Discussion	177
5.7 Acknowledgments	182
5.8 References	183
5.9 Supplementary figures	186
5.10 Résultats connexes	189
Chapitre 6 – Discussion et perspectives	191
6.1 Réflexion sur le rôle de la signalisation adénoenergique dans la commutation isotypique	191
6.2 Réflexion sur l’immunisation contre <i>S. pneumoniae</i> chez les patients atteints de la LLC	192
6.3 Discussion du rôle de l’axe adénoenergique dans la progression de la LLC	193
6.3.1 CD73 et l’immunité anti-tumorale dans la LLC	193
6.3.2 La signalisation A2a dans la LLC	194
6.3.3 Relation entre le sexe et CD73 dans la progression de la LLC	196
6.4 Réflexion sur le rôle pro-tumorigénique intrinsèque de CD73 dans la LLC	197
6.4.1 Le métabolisme cellulaire dans la LLC	197
6.4.2 Réflexion sur la relation entre le sexe, le métabolisme cellulaire et CD73	198
6.5 Le métabolisme et la signalisation adénoenergique dans les cellules cancéreuses	198
6.5.1 La voie de signalisation de PGC1 α	199
6.5.2 Le complexe PDH	199
6.5.3 L’adénosine et l’inosine intracellulaire	200
6.6 CD73 et la voie de récupération du NAD ⁺	200
6.7 CD73 et les dommages à l’ADN	201
6.7.1 Signalisation adénoenergique	201
6.7.2 La voie de synthèse des pyrimidines	202
6.7.3 Voie de signalisation cGAS-STING	202
6.7.4 Résistance à la chimiothérapie	204
6.8 Réflexion sur la glycolyse et CD73	205

6.9 Réflexion sur les cellules souches cancéreuses et le rôle métabolique de CD73	205
6.10 Opportunités thérapeutiques et CD73	206
6.10.1 Biguanides	206
6.10.2 Inhibiteurs de la glutaminolyse	207
6.10.3 Les inhibiteurs de PARP	208
6.11 Réflexion et perspectives sur l'étude du métabolisme cellulaire	209
6.11.1 Perspectives sur le rôle de CD73 dans le métabolisme des cellules cancéreuses	211
6.11.2 Perspectives sur le rôle de CD73 et le métabolisme cellulaire dans d'autres pathologies	213
6.12 Réflexion et perspectives sur le rôle de CD73 dans le métabolisme des cellules immunitaires	213
6.12.1 Lymphocytes T CD8	213
6.12.2 Tregs	216
6.12.3 Lymphocytes B	218
6.13 Discussion des limitations des modèles expérimentaux utilisés.....	218
6.13.1 Les souris de laboratoire et l'activité du système immunitaire.....	218
6.13.2 Les souris transgénique E μ -TCL1 et la LLC humaine	219
6.13.3 L'absence de CD73 chez la souris et l'humain	219
6.13.4 Les limitations des études métaboliques <i>in vitro</i>	220
6.14 Conclusion générale de la thèse	221
Références	223
Annexes	263

Liste des figures

Figure 1.1 – Composantes moléculaires et structurales de l’adénosine triphosphate (ATP) et ses dérivés (ADP, AMP, adénosine)	28
Figure 1.2 – Voies extracellulaires et intracellulaires de production, de consommation et de signalisation de l’adénosine et des composantes de l’axe adénoenergique	30
Figure 1.3 – Profils d’expression des gènes encodant pour les nucléotidases CD73 et CD39 dans les tissus normaux et tumoraux à travers divers cancers humains	34
Figure 1.4 – Voies de signalisation intracellulaire médiées par l’activation du récepteur A2a sur les lymphocytes T	37
Figure 1.5 – Représentation graphique des activités biologiques exercées par la signalisation adénoenergique sur les cellules immunitaires et épithéliales	38
Figure 1.6 – Structure cristalline de l’enzyme CD73 humaine, sous forme membranaire, en conformation ouverte et fermée	44
Figure 1.7 – Rôle de l’enzyme CD39 dans l’immunité anti-tumorale	51
Figure 1.8 – Caractérisation des lymphocytes B matures de rates de souris	62
Figure 1.9 – Proportion des cas de leucémies selon le type et la localisation géographique en 1990 et en 2017	65
Figure 1.10 – Composantes à valeurs pronostiques dans la LLC	67
Figure 1.11 – L’axe adénoenergique est régulé positivement dans la LLC	78
Figure 1.12 – Rôle immunosuppresseur de l’adénosine dans la niche lymphoïde dans la LLC	82
Figure 1.13 – Représentation schématique des différences énergétiques entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et aérobie (effet Warburg) dans les cellules non-cancéreuses et cancéreuses	84
Figure 1.14 – La glycolyse	86
Figure 1.15 – Le cycle de Krebs	88
Figure 1.16 – La chaîne de transport d’électron	91
Figure 1.17 – Composantes moléculaires et structurales du NAD ⁺ et ses dérivés	93
Figure 1.18 – Les voies de biosynthèses du NAD ⁺	95
Figure 3.1 – CD73 expression on B-1 B cells.....	116
Figure 3.2 – Preserved steady-state functions of B-1 B cells in CD73-deficient mice.....	118

Figure 3.3 – CD73-deficiency is associated with delayed IgG3 response after Pneumovax 23 vaccination	120
Figure 3.4 – A2aR-deficiency is associated with delayed IgG3 response after Pneumovax 23 vaccination	121
Figure 3.5 – A2a receptor agonist enhances Pneumovax 23 response in young mice	123
Figure S3.1 – CD73 KO mice have normal Ig levels	128
Figure S3.2 – A2a-deficient KO mice have preserved peritoneal B-1 B cell populations	129
Figure S3.3 – A2a KO vaccinated mice have normal PPS3 specific IgA levels	130
Figure C3.1 – L’expression de CD73 n’influence pas la survie des lymphocytes B-1 murins	131
Figure C3.2 – L’expression de CD73 n’influence pas la commutation de classe isotypique <i>in vitro</i>	131
Figure 4.1 – CD73 and CD39 expression is upregulated on non-leukemic lymphocytes upon disease progression	138
Figure 4.2 – CD73-deficiency prolongs survival of E μ -TCL1 males	139
Figure 4.3 – CD73 ^{-/-} E μ -TCL1 males display increased splenic T cells shift toward effector phenotype and IFN- γ neutralization abrogates their prolonged survival.....	140
Figure 4.4 – CD73 may predict for worse outcome in CLL patients.....	142
Figure S4.1 – Characterization of the E μ -TCL1 mouse model and gating strategy of leukemic CLL and normal B and T cells using CD5, B220 and CD39 phenotypic markers.....	149
Figure S4.2 – CD39 expression pattern of circulating T cells, normal B cells and leukemic cells in CD73 ^{-/-} E μ -TCL1 mice	150
Figure S4.3 – Splenocyte phenotypic characterization of 8 months-old E μ -TCL1 mice	151
Figure S4.4 – Sex-dependent hormones-ablation do not influence CLL-like disease in E μ -TCL1 mice.....	152
Figure S4.5 – CD73, CD39 and A2a mRNA levels in CLL patients with poor prognostic mutational status	152
Figure S4.6 – CD73, CD39 and A2a expression pattern in CLL patients	153
Figure C4.1 – Les souris transgéniques E μ -TCL1 mâles ou femelles ne présentent pas d’avantage de survie en absence du récepteur A2a	154
Figure 5.1 – CD73 promotes tumor growth independently from immune suppression through aspartate biosynthesis	168

Figure 5.2 – CD73 regulates metabolic fitness of cancer cells independently from adenosine signaling	171
Figure 5.3 – CD73 promotes mitochondrial respiration but not mitochondrial biogenesis	173
Figure 5.4 – CD73 regulates cancer cells’ metabolic fitness through the NAD ⁺ salvage pathway	175
Figure 5.5 – CD73 contributes to PARP-dependent DNA-damage repair in response to chemotherapy	177
Figure 5.6 – CD73 promotes metabolic fitness of cancer cells	182
Figure S5.1 – CD73 knockout efficacy and analysis of proliferation assay using Incucyte live imaging technology	186
Figure S5.2 – Glucose and glutamine SITA and transcriptional analysis of TCA cycle enzymes in MDA-231 cells	187
Figure S5.3 – Generation of mouse CRISPR CD73-knockout cell lines, strategy for cancer stem (CSC) like cells sorting and CD73 expression on primary fibroblasts from mice genetically deficient for CD73	188
Figure S5.4 – Extracellular metabolism of NMN by CD73	188
Figure S5.5 – CD73-deficient cells sustain higher chemotherapy-induced DNA-damage over time	188
Figure C5.1 – L’expression de CD73 ne régule pas la phosphorylation de la sous-unité E1 α du complexe PDH dans les cellules MDA-MB-231	189
Figure C5.2 – L’activation de la voie cGAS-STING est augmentée dans les MDA-MB-231 déficientes pour CD73	189
Figure C5.3 – Les cellules déficientes pour CD73 sont plus sensibles à la doxorubicine <i>in vitro</i>	190
Figure C5.4 – L’absence de CD73 sensibilise les cellules cancéreuses aux biguanides <i>in vitro</i>	190
Figure C5.5 – L’inhibition de CD73 induit l’activation d’AMPK dans les MDA-MB-231	190
Figure 6.1 – L’inhibition du récepteur A2a rétablit la production d’IFN- γ des lymphocytes T CD8 dans un modèle de souris de LLC.....	194
Figure 6.2 – Représentation graphique du modèle selon lequel l’activation de cGAS dans les cellules tumorales induit une réponse immunitaire anti-tumorale via l’activation de STING ...	203

Figure 6.3 – Le metformin réduit la croissance tumorale ainsi que les niveaux de NAD ⁺ et d’aspartate intra-tumoraux	211
Figure 6.4 – Représentation schématique de l’effet hypothétique de CD73 dans la conversion du NMN en NR dans le microenvironnement tumoral et de l’effet du NR sur la croissance tumorale	212
Figure 6.5 – Profil métabolique des lymphocytes T CD8 de souris exprimant CD73 ou non activés <i>in vitro</i>	214
Figure 6.6 – Profil métabolique des lymphocytes T selon leur stade d’activation	216
Figure 6.7 – Représentation schématique de la reprogrammation métabolique des Tregs	217

Liste des tableaux

Tableau 1.1 – Valeur pronostique des composantes de l’axe adénoenergique dans les cancers humains	55
Tableau 1.2 – Taux de sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>S. pneumoniae</i> recensé par le centre de contrôle et prévention des maladies des États-Unis (CDC) en 2018	59
Tableau 1.3 – Noms et compositions des vaccins approuvés pour la prévention des infections à <i>S. pneumoniae</i>	60
Tableau 1.4 – Systèmes Rai et Binet utilisés pour la classification du niveau de risque des patients atteints de la LLC	70
Tableau 1.5 – Critères définissant les types de réponses cliniques possibles suivant le traitement de la LLC	71
Tableau 1.6 – Algorithme décisionnel du choix des traitements de première ligne pour les patients atteints de la LLC	76
Tableau 1.7 – Caractéristiques des modèles de souris transgéniques qui modélisent une LLC murine	83
Tableau 3.1 – CD73 KO mice have similar numbers of major B cell subsets	117
Tableau 4.1 – CLL samples characteristics	141

Liste des abréviations

2-NBDG	2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose
4-1BB	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 9</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACDC	<i>arterial calcification due to deficiency of CD73</i>
ADA	adénosine désaminase
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ADK	adénosine kinase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ADPR	ADP ribose
AHR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
AK	adénylate kinase
Akt	protéine kinase B
ALDH	aldéhyde déshydrogénase
ALT	alanine aminotransférase
AML	<i>acute myeloid leukemia</i>
AMP	adénosine monophosphate
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
APRIL	<i>A proliferation-inducing ligand</i>
ARN	acide ribonucléique
ASCT2	<i>alanine, serine, cysteine transporter 2</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	adénosine triphosphate
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B cell lymphoma extra large</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHE	Barrière hématoencéphalique
BR	bendamustine et rituximab
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>

BRCA(1/2)	<i>breast cancer gene 1/2</i>
BTK	<i>Bruton tyrosine kinase</i>
CAC	cycle de l'acide citrique
cADPR	ADP ribose cyclique
CAF	<i>cancer associated fibroblast</i>
cAMP	AMP cyclique
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
Casp	caspase
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR3	<i>complementary-determining region 3</i>
cGAMP	GMP-AMP cyclique
cGAS	GMP-AMP synthase
CI	complexe I (de la ETC)
CIITA	<i>class II major histocompatibility complex transactivator</i>
CNT	<i>concentrative nucleoside transporter</i>
CoQ	coenzyme Q
CSC	<i>cancer stem cells</i> / cellules souches cancéreuses
Csk	<i>c-terminal Src kinase</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CVID	<i>common variable immunodeficiency disease</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine 12</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor 4</i>
CytC	cytochrome C
dbcAMP	<i>dibutyryl cyclic AMP</i>
DC	cellule dendritique
del(17p)	délétion du chromosome 17p
DLBCL	<i>diffuse large B cell lymphoma</i>
DON	6-Diazo-5-oxo-L-norleucine
ECAR	extracellular acidification rate
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMT	<i>epithelial to mesenchymal transition</i>
ENT	<i>equilibrative nucleoside transporter</i>
EPAC	<i>exchange factor directly activated by cAMP</i>
ER	<i>estrogen receptor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ETC	<i>electron transport chain</i>
FAD	flavine adénine dinucléotide

FCCP	carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FCR	fludarabine, cyclophosphamide et rituximab
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FDC	<i>follicular dendritic cells</i>
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
Fra-1	<i>Fos-related antigen 1</i>
G3PDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GLS	glutaminase
GITR	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 18</i>
GLUD	glutamate déshydrogénase
GLUT	<i>glucose transporter</i>
GOT(1/2)	glutamate-oxaloacétate transaminase
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPI	Glycosylphosphatidyl-inositol
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF-1(α/β)	<i>hypoxia-inducible factor 1 (alpha/beta)</i>
Hk2	hexokinase-2
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IGHV	<i>immunoglobulin heavy chain gene</i>
IL	interleukine
IRF4	<i>interferon regulatory factor 4</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LAG-3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LDH	lactate déshydrogénase
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LPS	lipopolysaccharides
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MCA	méthylcholanthrène
MCL-1	<i>myeloid cell leukemia-1</i>
MCL	<i>mantle cell lymphoma</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressive cell</i>

MEF	<i>mouse embryoblastic fibroblasts</i>
MEK	MAPK/ERK kinase
MET	metformin
MHC-II	<i>major histocompatibility complex II</i>
MPC	<i>mitochondrial pyruvate carrier</i>
MRD	<i>minimal residual disease</i>
MSC	<i>mesenchymal stromal cells</i>
NA	acide nicotinique
NAAD	acide nicotinique adénine dinucléotide
NAD+	nicotinamide adénine dinucléotide
NADS	NAD synthase
NAM	nicotinamide
NAMN	acide nicotinique mononucléotide
NAMPT	NAM phosphoribosyl-transférase
NAPRT	acide nicotinique phosphoribosyltransférase
NDPK	nucléoside diphosphate kinase
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NICD	<i>notch intracellular domain</i>
NK	<i>natural killer</i>
NKT	<i>natural killer T cells</i>
NMN	nicotinamide mononucléotide
NMNAT	NMN adenylyltransférase
NOXA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NPP	<i>nucleotide pyrophosphatase-phosphodiesterase</i>
NR	nicotinamide riboside
NRF(1/2)	<i>nuclear respiratory factor 1/2</i>
NRK	nicotinamide riboside kinase
NRLP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
OCT3	<i>organic cation transporter 3</i>
OCR	oxygen consumption rate
OD	<i>optical density</i>
OX40	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 4</i>
OxPhos	phosphorylation oxydative
PAF	<i>platelet-activated factor</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>

PAP	<i>prostatic acid phosphatase</i>
PAR	poly(ADP-ribose)
PARP	PAR polymérase
PC	phosphorylcholine
PCV	<i>Pneumococcal conjugate vaccine</i>
PD-1	<i>program cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>program death-ligand 1</i>
PDH	pyruvate déshydrogénase
Pgam	phosphoglycérate mutase-1
PGC1 α	<i>Pparg coactivator 1 alpha</i>
PGE2	prostaglandine E2
PHE	phenformin
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	phosphokinase C
PLC	phospholipase C
PNP	<i>purine nucleoside phosphorylase</i>
PPS3	polysaccharides de pneumocoque de type 3
PPV	<i>Pneumococcal polysaccharide vaccine</i>
PR	<i>progesterone receptor</i>
PtC	phosphatidylcholine
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Rap	<i>Ras-related protein 1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	<i>room temperature</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SF3B1	<i>splicing factor 3B subunit 1</i>
SIRT	<i>Sirtuin</i>
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription1</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TCA	<i>tricarboxylic acid</i>
TCL1	<i>T-cell leukemia/lymphoma 1</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TFAM	<i>transcription factor A, mitochondrial</i>
TGF- β	<i>tumor growth factor beta</i>
TI	<i>T cell-independent</i>

TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNAP	<i>tissue non-specific alkaline phosphatase</i>
TNBC	<i>triple negative breast cancer</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNFR2	<i>tumor necrosis factor receptor 2</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAMP	<i>transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate</i>
Tregs	Cellules T régulatrices
TREX1	<i>three prime repair exonuclease 1</i>
Trp	tryptophane
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZAP-70	<i>zeta-chain-associated Protein Kinase 70</i>

Remerciements

C'est tôt dans mon parcours universitaire que s'est développé mon intérêt pour la recherche académique. C'est dans les cours des Dr John Stagg et Dr Moise Bendayan que ma curiosité du domaine de l'oncologie et la recherche fondamentale s'est éveillée. À la recherche d'un stage de fin de baccalauréat, j'ai eu la chance de m'entretenir avec John et d'obtenir une porte d'entrée dans ce qui deviendra l'expérience la plus enrichissante de ma vie.

Pour ta confiance, les ressources, la motivation, les projets et les rôles que tu m'as confiés et plus que tout pour avoir cru en moi pendant toutes ces années, je t'en suis profondément reconnaissant, merci John. Merci de m'avoir laissé faire partie de ton équipe dynamique. Tu as été un exemple de mentor qui continuera à m'inspirer tout au long de ma carrière scientifique; qui je l'espère sera aussi prolifique que la tienne. Tu m'as permis de contribuer à divers projets ainsi qu'à l'écriture de plusieurs articles de sorte à rendre mon passage dans ton laboratoire encore plus enrichissant. Merci Sandra d'avoir été une ressource indispensable à tous les niveaux et de m'avoir montré les rudiments de la recherche en laboratoire. Merci Isabelle pour l'aide inestimable dans la conduite de plusieurs expériences. Merci Bertrand de m'avoir laissé t'aider dans tes projets ambitieux et rafraichissants ainsi que ta disponibilité à toute heure du jour. Tu as été une ressource précieuse durant mes études. Merci à Loïse et Priscilla pour l'immense aide dans l'expérimentation animale; vous m'avez facilité la tâche plus d'une fois. *Thank you, Pavel, for helping and mentoring me throughout my projects and also for all those late afternoon talks about science and whatnot.* Merci Martin et Marjorie, autant sur le plan académique que personnel, d'avoir partagé une importante partie de votre cheminement avec le mien. Merci à plusieurs autres pour l'aide technique à l'analyse, la manipulation de divers instruments et la conduite d'expériences à travers mon parcours : Yacine Barèche, Eric Ma, Bozena Samborska, Daina Avizonis, Julien Lamontagne et Alexia Grangeon, Hubert Fleury et Maxime Cahuzac, Mélissa Cloarec, Pamela Thébault, Dominique Gauchat et Philippe St-Onge, Suzanne Vincent et Helen Loo Yau. Enfin, merci à l'ensemble des membres passés et présents du laboratoire et de la communauté de l'institut du cancer de Montréal (ICM) pour l'agréable compagnie sans qui l'expérience n'aurait pas été la même.

À travers mon parcours académique, j'ai eu la chance de participer à plusieurs conférences et discussions qui ont grandement agrémenté mes projets de thèse. Pour leur soutien financier et/ou l'organisation d'événements marquants, je remercie donc la faculté de pharmacie de l'université de Montréal, FRQS, CRCHUM, ICM, BioCanRx, Agilent (Dre Bahar Rizi), RRCancer, iTNT, Universidade de São Paulo/SSM10 (*e miei amici Salvo e Marta*). Je remercie les Dr Gerardo Ferbeyre et Dr Francis Rodier pour leur immense apport quant au suivi et l'encadrement de mes projets ainsi que les collaborateurs avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant mes études : Dr Daniel de Carvalho, Dr Russell Jones, Dre Nathalie A Johnson et Dr Charles Brenner. Je remercie également les membres du jury qui ont pris le temps de lire et évaluer cette thèse.

Enfin, d'un point de vue personnel, je remercie mes parents (Roseline et Gilbert) pour leur appui inconditionnel, ma famille (Julie-Anne, Martin, Agatha, Evelyne, Jean-Sébastien, Sasha, Alexandre, Laurence) et mes amis proches (Alex, Alexandre, Cédrik, Dany, Jean-Sébastien, Jonathan, Maxime C, Maxime CT, Nicolas, Simon, Xavier) pour leur présence et pour avoir rendu ma vie plus agréable en dehors du laboratoire. Finalement, je remercie du plus profond de mon cœur ma conjointe, Sonia, sans qui mes efforts auraient été en vain, sans qui les succès auraient été fades et les échecs infiniment plus difficiles à surmonter. Merci de ta tolérance, ta patience, ta compréhension et ton support lorsque mes humeurs sont lourdes et lorsque mes horaires t'esseulent. Rien de ceci n'aurait été possible sans toi.

سنية اعيشك، نحبك اكثر من كل شيء

Sonia aychek, nhabek akther men kol chay

Avant-propos

Dans son ouvrage « biographique » du cancer hautement prisé, l'oncologue américain Siddhartha Mukherjee décrit le cancer comme étant l'empereur de toutes les maladies (*the emperor of all maladies*; réf. 930). En retraçant les anecdotes et évidences historiques qui nous sont disponibles, on y comprend que cette maladie, devant laquelle l'humain s'est longtemps senti fort impuissant, n'est pas qu'un mal contemporain. La recherche d'interventions thérapeutiques, parfois occulte, se perpétue depuis des millénaires maintenant. Et malgré les importantes avancées récentes dans l'histoire moderne quant à notre compréhension de la maladie, de sa prévention et de son traitement, son diagnostic en est encore trop souvent à glacer le sang.

Durant un discours prononcé suivant sa nomination pour le prix Nobel de la médecine en 1989 pour la découverte de l'origine des oncogènes, le Dr Harold E. Varmus décrit les cellules cancéreuses comme étant des versions déformées des cellules saines (*a distorted version of our normal selves*) en faisant référence à l'utilisation malveillante de certains gènes (oncogènes) présents dans l'ensemble des cellules qui composent l'être humain. Depuis la découverte du concept d'oncogène dans les années 1970, la recherche s'est intensifiée de sorte à identifier divers points faibles exploitables de ces cellules transformées, marquant ainsi le début de l'ère des thérapies ciblées. Cependant, la variabilité interindividuelle, l'hétérogénéité tumorale et l'impressionnante plasticité des cellules cancéreuses limitent parfois leur potentiel thérapeutique. Dans l'optique du développement de thérapies plus généralisables, en exploitant le caractère irrégulier des cellules cancéreuses et en libérant la puissante précision du système immunitaire contre celles-ci, l'immunothérapie s'impose rapidement dans la dernière décennie pour son potentiel curatif remarquable de longue durée. Pour leur importante contribution à ce champ de recherche, les pionniers Dr Jim Allison et Dr Tasuku Honjo sont d'ailleurs récompensés du prix Nobel de médecine en 2018.

En s'inscrivant dans le domaine de l'immunothérapie du cancer, les travaux de Dr John Stagg démontrent le potentiel thérapeutique de cibler l'enzyme CD73 en cancer, pour la première fois, il y a 10 ans (réf. 148), ouvrant la porte à un univers excitant de recherche. Démontrant bien l'effervescence de la recherche entourant CD73 et l'axe adénosinergique, alors que seulement 5

essais cliniques ciblant cet axe étaient recensés en 2019 (réf. 27), plus de 30 essais cliniques sont en cours à ce jour (réf. 6). De façon à maximiser le potentiel thérapeutique actuel et futur que renferme cet axe, les travaux présentés dans cette thèse visent à approfondir nos connaissances quant aux fonctions biologiques de l'enzyme CD73, qui s'étendent au-delà de son rôle dans l'immunité anti-tumorale.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 L'axe adénoenergique

L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule essentielle au fonctionnement cellulaire. L'ATP est structurellement basée d'un nucléoside, soit l'adénosine composée d'une base azotée (adénine) et d'un ribose, et de trois groupements phosphates (**Figure 1.1**). L'ATP est universellement reconnue comme étant l'unité énergétique centrale dans l'orchestration de plusieurs processus cellulaires via l'hydrolyse, la formation ou le transfert de ses groupements phosphates (1). L'ATP, initialement décrite pour son rôle dans la contraction musculaire, est longtemps crue restreinte au milieu intracellulaire jusqu'en 1972, alors que le rôle de l'ATP dans la neurotransmission est décrit via son relargage dans le milieu extracellulaire (2). Les rôles de l'ATP dans les processus physiologiques normaux et pathophysiologiques ont depuis été largement étudiés, notamment vis-à-vis l'axe adénoenergique et la régulation de l'homéostasie immunologique. Au niveau extracellulaire, l'ATP peut d'une part stimuler une signalisation intracellulaire via l'activation de récepteurs purinergiques ou d'autre part être métabolisée en dérivés d'adénosine phosphorylés ou non (**Figure 1.1**).

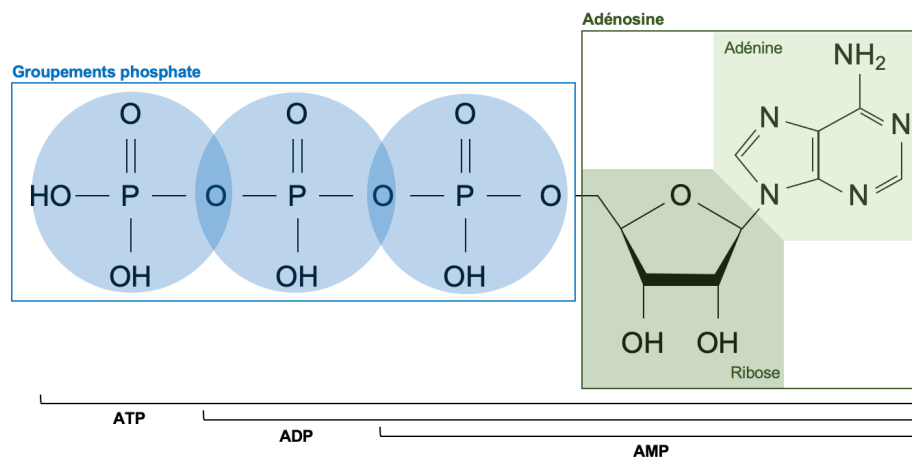


Figure 1.1 – Composantes moléculaires et structurales de l'adénosine triphosphate (ATP) et ses dérivés (ADP, AMP, Adénosine).

1.1.1 Présentation des acteurs de l'axe adénoenergique

L'ATP peut être relâchée dans le milieu extracellulaire via des stress cellulaires tels que des dommages à la membrane cellulaire, des torsions mécaniques ou l'exposition à des agents

cytotoxiques (3). La sécrétion d'ATP dans le milieu extracellulaire s'effectue également par des canaux de type pannexine (Panx), par des jonctions construites par les connexines (Conx), par des transporteurs de la famille ABC (*ATP-binding cassette*), par les récepteurs purinergique P2X7 ainsi que par l'exocytose active de vésicules (4). Notamment, l'ATP est relâchée par les cellules apoptotiques suivant l'activation de Panx1 par les caspases-3 et -7 (5). Dans le milieu extracellulaire, l'ATP peut être dégradée en adénosine suivant trois étapes de déphosphorylation consécutive en passant par les formes d'adénosine diphosphate (ADP) et d'adénosine monophosphate (AMP). Ces transitions d'une forme phosphorylée ou non-phosphorylée à l'autre s'effectuent selon l'activité de plusieurs enzymes membranaires et solubles (**Figure 1.2**).

1.1.1.1 Nucléotidases, phosphatases et kinases

L'enzyme CD39 (ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase 1) est responsable de la déphosphorylation de l'ATP en ADP et de l'ADP en AMP alors que l'ecto-5'-nucléotidase CD73 est principalement responsable de la déphosphorylation de l'AMP en adénosine (**Figure 1.2**) (6). À moindre effet, l'hydrolyse de l'AMP en adénosine peut aussi être faite par des phosphatases alcalines telles que PAP (*prostatic acid phosphatase*) et TNAP (*tissue-non-specific alkaline phosphatase*) (7, 8). Alors que les réactions enzymatiques d'hydrolyse de l'ATP et l'ADP sont réversibles via l'activité de phosphorylation des kinases membranaires AK (adénylate kinase) et NDPK (nucléoside diphosphate kinase), la déphosphorylation de l'AMP est plutôt irréversible au niveau extracellulaire et fait de CD73 l'enzyme limitante dans la génération de l'adénosine extracellulaire (8-10).

1.1.1.2 Voie alternative de production d'adénosine

Alors que la déphosphorylation de l'ATP par CD39 en amont de CD73 caractérise la voie conventionnelle de la production d'adénosine, l'AMP peut être générée également via la dégradation d'un autre substrat, soit le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), par deux autres enzymes (**Figure 1.2**). En effet, l'ecto-hydrolase CD38 (aussi appelée ADP-ribosyl cyclase) libère le nicotinamide et métabolise le NAD⁺ en ADP ribose (ADPR) (11). L'ADPR est ensuite converti en AMP via l'activité enzymatique de la pyrophosphatase/phosphodiesterase de nucléotides (NPP) CD203a (11). L'AMP produite ainsi est ensuite susceptible d'être convertie en adénosine via

l'enzyme CD73. Tout comme l'ATP, en plus du relargage passif, le NAD⁺ peut être exporté dans le milieu extracellulaire via des transporteurs, plus particulièrement le canal Cx43 (12).

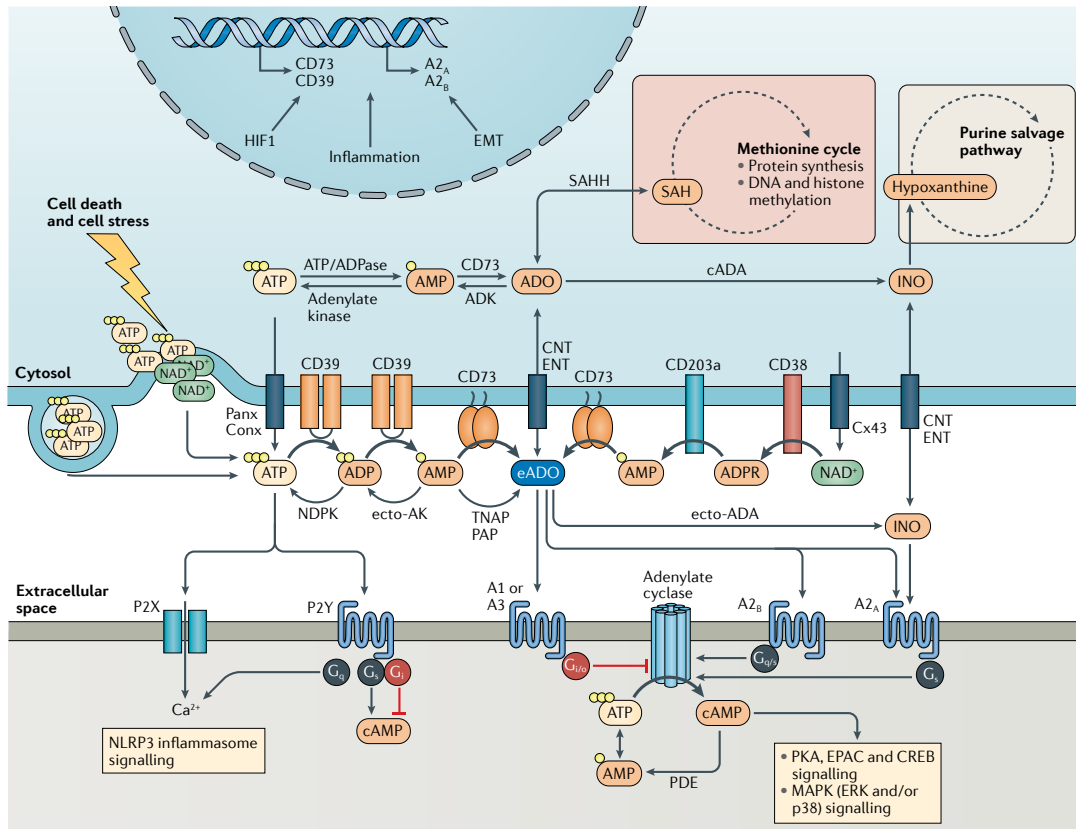


Figure 1.2 – Voies extracellulaires et intracellulaires de production, de consommation et de signalisation de l'adénosine et des composants de l'axe adénosinergique. L'ATP est relâchée dans le milieu extracellulaire via des mécanismes passifs (mort cellulaire), actifs (via Conx et Panx) ou via des granules. L'ATP extracellulaire peut activer les récepteurs purinergiques P2 (P2X et P2Y) et initier une signalisation dépendante de l'inflammasome (NLRP3=*NOD*-, *LRR*- and *pyrin domain-containing protein 3*). Alternativement, la voie traditionnelle de dégradation de l'ATP en adénosine extracellulaire implique l'activité hydrolytique séquentielle des nucléotidases CD39 et CD73. L'hydrolyse de l'ATP en ADP et en AMP par CD39 est réversible via l'adenylate kinase extracellulaire (ecto-AK) et la nucléoside diphosphate kinase (NDPK). Une autre voie de dégradation non-traditionnelle a aussi été décrite : le nicotinamide dinucléotide (NAD⁺) est utilisé comme substrat par CD38 qui permet la génération d'ADP-ribose (ADPR) qui est ensuite métabolisé en AMP par l'enzyme ENPP1 (CD203a). L'adénosine extracellulaire (eADO) peut (1) activer des récepteurs purinergiques P1 (A1, A2a, A2b et A3), (2) être métabolisée en inosine (INO) par l'adénosine désaminase sécrétée ou membranaire (ecto-ADA) ou (3) être transportée dans la cellule via les transporteurs de nucléosides (ENT, CNT). Dans le cytosol, l'adénosine (ADO) peut (1) être catabolisée en INO via une forme cytosolique de l'ADA (cADA), (2) être convertie en S-adenosyl-homocysteine (SAH) via la SAH hydrolase (SAHH) ou (3) être phosphorylée de nouveau en AMP via l'adénosine kinase (ADK). L'ATP intracellulaire peut ensuite être générée depuis l'AMP et l'ADP via l'activité des adénylates kinases intracellulaires (ADK). Le cAMP et l'AMP intracellulaires peuvent aussi être générés depuis l'ATP via les activités de l'adénylate cyclase et des phosphodiesterases (PDE) respectivement. Les récepteurs A2a et A2b activent alors que les récepteurs A1 et A3 inhibent l'activité de l'adénylate cyclase de sorte à moduler différemment la signalisation dépendante de cAMP. Enfin, l'INO peut aussi initier une signalisation via le récepteur A2a. CREB=*cAMP-responsive element-binding protein 1*; Cx43=connexine 43; EMT=transition épithélio-mésenchymateuse; EPAC=*exchange protein directly activated by cAMP*; PAP= prostatic acid phosphatase; TNAP= tissue-non-specific alkaline phosphatase.

© Reproduit de Allard et al. Nat Rev Clin Oncol, 2020. Avec la permission de Springer Nature.

1.1.1.3 Signalisation purinergique

La balance entre le relargage d'ATP et la production d'adénosine joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du système immunitaire via l'activation de récepteurs purinergiques exprimés à la surface des cellules immunitaires (6). La signalisation intracellulaire activée par les molécules de l'axe adénosinergique est médiée via l'activation de deux types de récepteurs purinergiques; les récepteurs de type P1 qui sont activés par l'adénosine et les récepteurs de type P2 qui sont activés par l'ATP et l'ADP (**Figure 1.2**) (13).

Les récepteurs de type P2 sont catégorisés en deux groupes : les récepteurs ionotropes P2X et métabotropes P2Y (14). Il existe 7 sous-types de canaux cationiques/récepteurs P2X qui, lorsqu'activés, permettent le transport des cations sodiques (Na^+), potassiques (K^+) et calciques (Ca^{2+}) (14). L'activation du récepteur P2X₇ varie selon l'abondance d'ATP qui à forte concentration induit la mort cellulaire (15). Le récepteur P2X₇ est toutefois surtout impliqué dans l'activation du complexe de l'inflammasome dépendant de NLRP3 (14). Sinon, il existe 8 sous-types de récepteurs P2Y couplés à des protéines G (GPCR) qui, lorsqu'activés, régulent soit le largage de calcium du réticulum endoplasmique via l'activation de la phospholipase C (PLC) ou l'activité de l'adénylate cyclase et les niveaux intracellulaires d'AMP cyclique (cAMP) (15).

Alternativement, l'adénosine exerce ses fonctions biologiques principalement via l'activation de 4 types (P1) de GPCR : A2a, A2b, A1 et A3 (16). Les voies de signalisation en aval des récepteurs à l'adénosine dépendent du type de protéine G couplée au récepteur et varie selon le type cellulaire. De façon générale, leur activation module l'activité de l'adénylate cyclase et les niveaux intracellulaires de cAMP (14).

1.1.1.4 Recyclage intracellulaire et dégradation de l'adénosine

L'adénosine ne possède qu'un très court temps de demi-vie dans le milieu extracellulaire (17). En effet, l'adénosine non liée aux récepteurs purinergiques de type P1 peut d'une part être recyclée de façon intracellulaire via les transporteurs d'équilibration (ENT) ou de concentration (CNT) de nucléosides ou d'autre part être dégradée en inosine via l'activité enzymatique de l'adénosine désaminase (ADA) soluble ou membranaire (**Figure 1.2**) (6). L'adénosine intracellulaire peut ensuite être recyclée en AMP et puis en ATP via l'activité de phosphorylation

des kinases cytosoliques ADK (adénosine kinase) et AK respectivement (6). Quelques études suggèrent un rôle pro-apoptotique au transport intracellulaire d'adénosine (18-20). Finalement, l'inosine produite par désamination de l'adénosine peut également être recyclée au niveau intracellulaire via les mêmes transporteurs de nucléosides (ENTs/CNTs) où celle-ci exerce un rôle dans la voie de récupération des purines via sa conversion en hypoxanthine (21). De façon surprenante, il a été démontré que l'inosine inhibe la différenciation des lymphocytes T auxiliaires (Th1 et Th2) via le récepteur A2a (22). En effet, il est suggéré que l'inosine puisse stimuler la signalisation intracellulaire du récepteur A2a, mais pas d'A2b (23). Cependant, il est probable que la conversion de l'adénosine en inosine ne soit que pertinente en conditions pathologiques où les niveaux d'adénosine abondent étant donné les faibles niveaux d'adénosine en conditions physiologiques et la faible affinité de l'ADA pour celle-ci (24, 25).

1.1.2 Adénosine

Le rôle immunosuppresseur de l'adénosine est identifié pour la première fois en 1975, alors qu'il est démontré que celle-ci inhibe la capacité cytolytique des lymphocytes T dirigée contre une lignée de cellules cancéreuses de lymphome (26). Depuis, son rôle dans la régulation des réponses immunitaires anti-tumorales a été largement étudié (27). En plus de son activité immunosuppressive, l'adénosine exerce une panoplie d'activités biologiques impliquées dans divers processus physiologiques et pathologiques.

1.1.2.1 L'adénosine dans les processus physiologiques et pathologiques

L'adénosine exerce plusieurs rôles physiologiques, notamment vis-à-vis du système cardiovasculaire. D'abord, l'adénosine induit la vasodilatation coronarienne via le récepteur A2a (28) et inhibe l'enzyme TNAP qui convertit les pyrophosphates en phosphates inorganiques, un processus impliqué dans la calcification artérielle (29). Ensuite, l'adénosine favorise la livraison d'oxygène des érythrocytes via le récepteur A2b et suggère que l'accumulation d'adénosine plasmatique en conditions hypoxiques caractérise une réponse adaptative lors de l'acclimatation en haute altitude (30, 31).

Par ailleurs, l'adénosine est également impliquée dans les fonctions rénales, intestinales et hépatobiliaires. En effet, l'absence de signalisation adénosinergique favorise l'insuffisance rénale

aiguë (32), la colite intestinale (33-35) ainsi que la stéatose hépatique chez la souris (36, 37). CD73 et l'adénosine sont également impliqués dans la régulation de la perméabilité intestinale (38) ainsi que dans les fonctions pancréatiques et la production d'insuline chez les souris nourries d'une diète riche en gras (39). Finalement, des études ont démontré des rôles de la signalisation adénoenergique dans la régulation de l'homéostasie osseuse (40-45), de la neurotransmission glutaminergique et dopaminergique (46, 47) ainsi que de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (48, 49). Plus particulièrement, l'adénosine est principalement reconnue pour son rôle dans l'évasion de l'immunité anti-tumorale dans les cancers (6).

1.1.2.2 L'adénosine dans le microenvironnement tumoral

Alors qu'en condition physiologique très peu d'ATP est relâchée dans le milieu extracellulaire (nanomolaire), les concentrations d'ATP peuvent monter à des niveaux très élevés dans les tissus tumoraux (micromolaire) en résultat de stress cellulaires causés par l'hypoxie, le manque de nutriments et la mort cellulaire (6, 50). La relâche d'ATP dans le microenvironnement tumoral est également une caractéristique de la mort cellulaire immunogénique qui favorise les réponses inflammatoires via l'activation des récepteurs purinergiques P2 exprimés à la surface des cellules phagocytaires et des lymphocytes (4, 51). Par contre, la fréquente surexpression des nucléotidases CD39 et CD73 responsables de la dégradation de l'ATP peut contribuer à la création d'un microenvironnement suppressif via l'accumulation d'adénosine dans plusieurs cancers (**Figure 1.3**) (6). En effet, leur expression étant régulée par les facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α , le microenvironnement tumoral hypoxique favorise l'expression de CD73, CD39 et des récepteurs à l'adénosine A2a et A2b (38, 52-54). Contribuant davantage à l'accumulation d'adénosine dans le microenvironnement tumoral, le facteur de transcription HIF-1 α restreint l'expression de AK et des ENTs (55-57). Ainsi, l'oxygénation des tumeurs diminue les niveaux d'HIF-1 α , réduit la concentration d'adénosine dans le microenvironnement tumoral et rétablit le contrôle tumoral médié par les cellules NK et les lymphocytes T CD8 (58, 59). Enfin, l'adénosine est susceptible d'exercer des activités biologiques sur plusieurs types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral, dont les cellules cancéreuses, les cellules stromales et endothéliales non-cancéreuses ainsi que les cellules immunitaires qui infiltrent les tumeurs.

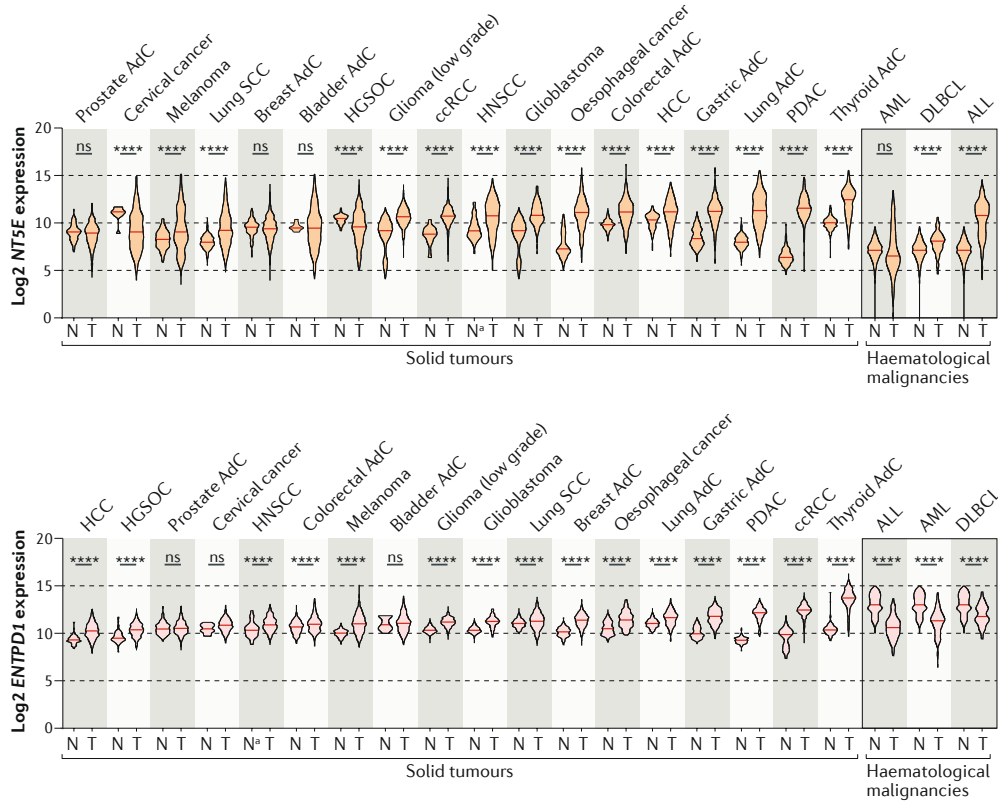


Figure 1.3 – Profils d’expression des gènes encodant pour les nucléotidases CD73 (*NT5E*) et CD39 (*ENTPD1*) dans les tissus normaux (N, N^a=normal adjacent) et tumoraux (T) à travers divers cancers humains. Les données de séquençage d’ARN (*RNA-seq*) été obtenues depuis la plateforme en ligne UCSC (*University of California, Santa Cruz*) Xena qui utilise la banque de données combinées de TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), TARGET et GTEx (*Genotype-Tissue expression*). À l’aide de cette banque de données, l’expression de *NT5E* et *ENTPD1* a été comparée à travers divers cancers humains entre les compartiments tumoraux (T) et normaux (N) via la sélection de donnée de RNA-seq normalisée par la méthode DESeq2 développée par la plateforme USCS Xena. Les analyses statistiques (test T de Student) ont été performé par le logiciel GraphPad prism. La distribution et l’expression médiane (ligne rouge) est montrée par diagramme en violon (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 et ****p<0.0001). AdC=adénocarcinome, SCC=carcinome à cellules squameuses, HGSOC=Carcinome ovarien séreux de haut grade, ccRCC=carcinome rénale à cellules claires, HNSCC=carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou, HCC=carcinome hépatocellulaire, PDAC=adénocarcinome canalaire du pancréas, AML=leucémie myéloïde aiguë, DLBCL=lymphome diffus à grandes cellules B, ALL=leucémie lymphoblastique aiguë.

© Reproduit et modifié à partir de Allard et al. Nat Rev Clin Oncol, 2020. Avec la permission de Springer Nature.

1.1.3 Récepteurs à l’adénosine

L’adénosine module positivement ou négativement l’activité de l’adénylate cyclase selon le type de GPCR activé. Alors que l’adénosine possède une affinité similaire pour les récepteurs A1, A3 et A2a avec des concentrations efficaces médiane (EC50) d’activation de 100nM, 290nM et 310nM respectivement, l’activation du récepteur A2b requiert des niveaux pathologiquement élevés d’adénosine de plus de 15µM (60). L’activation des récepteurs à l’adénosine régule diverses

voies de signalisations intracellulaires, notamment celle des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), qui sont impliquées dans la prolifération, la survie et la différenciation des cellules (61).

1.1.3.1 Les récepteurs A1 et A3

Les GPCR A1 et A3 sont généralement couplés à des protéines de type Gi, Gq ou Go et leur activation inhibe l'adénylate cyclase, diminue les niveaux de cAMP et inhibe la signalisation intracellulaire médiée par la protéine kinase A (PKA) (14). D'abord, ces récepteurs sont tous deux impliqués dans la néo-vascularisation des tumeurs via leur rôle pro-angiogénique sur les cellules endothéliales et via les monocytes (62-64). Leur activité biologique sur les cellules cancéreuses est cependant très variable d'un type cellulaire à l'autre. En effet, alors que l'activation du récepteur A1 inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de glioblastome (65, 66) et induit l'apoptose des cellules du cancer du côlon (67), son expression génique (*ADORA1*) est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de carcinomes hépatocellulaires (HCC) et favorise la prolifération et l'invasion, via la voie de signalisation PI3K/Akt, des cellules cancéreuses de HCC (68) et des cellules du cancer du sein (69, 70).

Le récepteur A3, quant à lui, est surtout impliqué dans l'apoptose des cellules cancéreuses. En effet, son activation induit une augmentation de l'expression des ligands pro-apoptotiques Fas et TRAIL et des caspases-8 et -3 dans les cellules de leucémie, du cancer de la thyroïde et du cancer du foie (71-75). Le récepteur A3 active également la voie intrinsèque d'apoptose dans les cellules du cancer de la prostate, du poumon, de la vessie et du rein (76-81). En plus de son rôle dans l'apoptose cellulaire, le récepteur A3 est décrit pour ses fonctions inhibitrices de la prolifération des cellules du cancer du sein, du mélanome, du côlon et du lymphome (82-91). Finalement, l'activation du récepteur A3 favorise la chimiotaxie des neutrophiles et la dégranulation des mastocytes (92, 93).

1.1.3.2 Les récepteurs A2

Les GPCR A2a et A2b sont généralement couplés à des protéines de type Gs et leur activation stimule l'adénylate cyclase de sorte à permettre la synthèse de cAMP qui mène à l'activation subséquente de PKA et de différentes voies de signalisation selon le type cellulaire (94). Par exemple, dans les lymphocytes T, l'isoforme principale de PKA se trouve ancrée dans

des radeaux lipidiques proches du récepteur des cellules T (TCR) et est responsable de la phosphorylation de la kinase proximale Csk, qui à son tour inhibe les kinases Fyn, Lyn et Lck (famille de kinases Src) empêchant ainsi le recrutement de la kinase ZAP-70 au niveau de la chaîne CD3 ζ du TCR (6). L'activation du récepteur A2a sur les lymphocytes T inhibe plusieurs voies de signalisation en aval du TCR dont celle des MAPK (ERK, JNK, p38), de PI3K et de PKC-NOTCH1 et diminue donc l'activité des facteurs de transcription FOX/JUN, NFAT, AP-1, NICD et NF- κ B qui résulte en une réduction de la production de plusieurs cytokine pro-inflammatoires et de survie (**Figure 1.4**) (6). L'activité immunosuppressive de l'activation du récepteur A2a sera présenté à la section suivante (1.1.3.3). L'AMP cyclique peut également activer une autre protéine effectrice soit EPAC qui à son tour active les petites enzymes à activité GTPase Rap1 et Rap2 qui sont impliquées dans la voie de signalisation MAPK et qui régulent la prolifération, sécrétion, différenciation et adhésion de diverses cellules (95-97). Notamment, l'adénosine générée par les cellules T régulatrices (Tregs) favorise la migration des cellules dendritiques (DCs) via l'activation du récepteur A2a et la voie de signalisation EPAC-Rap1 (98). Sinon, dans certaines cellules, le récepteur A2b peut également être couplé à une protéine de type Gq et activer la phospholipase PLC- β , la phosphokinase PKC ou la signalisation calcique dépendante de l'inositol-3-phosphate (IP₃) (99, 100). Finalement, il a été démontré que la signalisation A2a puisse contribuer à l'expression du récepteur A2b (101).

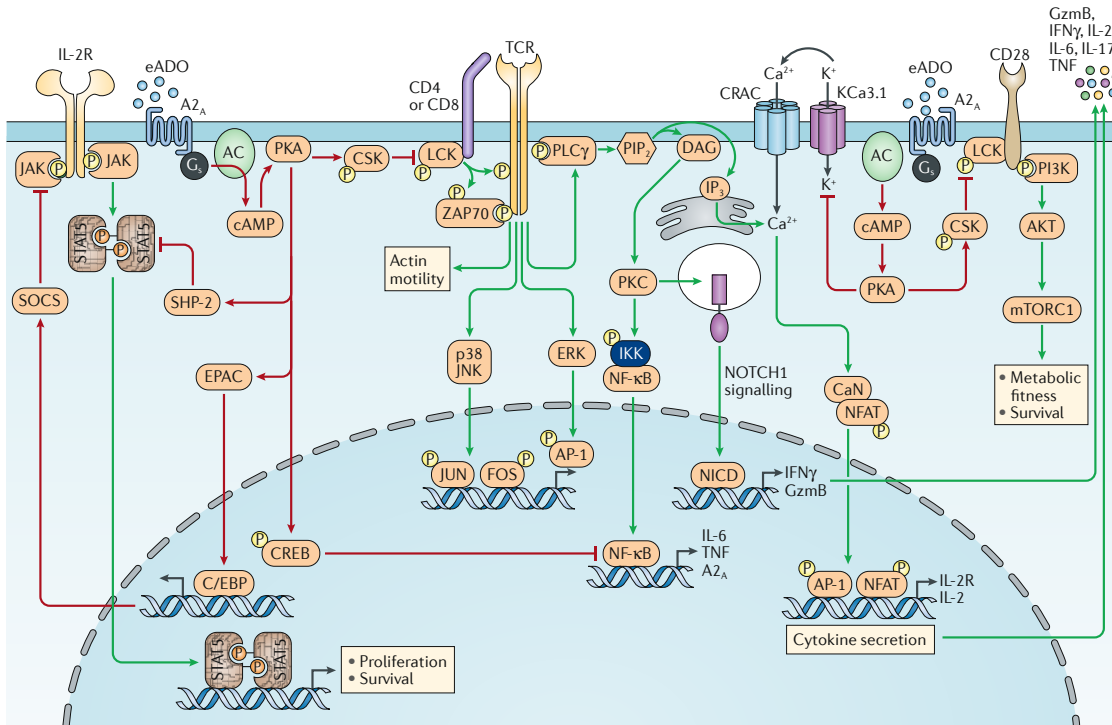


Figure 1.4 – Voies de signalisation intracellulaire médiées par l’activation du récepteur A2a sur les lymphocytes T. L’activation du récepteur A2a interfère avec la signalisation proximale du TCR de sorte à nuire à l’activation des lymphocytes T. La signalisation via A2a active l’adénylate cyclase (AC) qui permet la génération de cAMP, l’activation de PKA puis la phosphorylation de l’enzyme Csk. Csk peut ensuite phosphoryler et inactiver l’enzyme Lck, de sorte à bloquer le recrutement de ZAP-70 au niveau du TCR et empêchant ainsi l’activation de plusieurs kinases importantes (VAV1, ITK) impliquées dans la propagation de la signalisation en aval du TCR (ERK, JNK, p38, PLC γ -inositol 1,4,5-trisphosphate (IP $_3$)-Ca $^{2+}$ et/ou PLC-diacylglyc  l (DAG)-PKC). Ces effets résultent ensuite en l’atténuation de l’activation de facteurs de transcriptions importants au fonctionnement des lymphocytes T (FOX/JUN, NFAT, AP-1 et NF- κ B). L’inhibition de la voie de signalisation dépendante de PKC nuit également à la signalisation dépendante de NOTCH1 et la production d’IFN- γ et de granzyme B (GzmB). L’inhibition de Lck par A2a nuit également à la signalisation PI3K-AKT-mTOR en aval du récepteur de costimulation CD28. L’activation de PKA via A2a peut également activer le facteur de transcription CREB (*cAMP-responsive element-binding protein 1*) et/ou le canal potassique KCa3.1 de sorte à inhiber l’influx intracellulaire de calcium et à nuire à la transcription de l’IL-2 et de son récepteur (IL-2R) dépendant de NFAT.

   Reproduit de Allard et al. Nat Rev Clin Oncol, 2020. Avec la permission de Springer Nature.

1.1.3.3 Rôle des récepteurs A2 dans le système immunitaire

L’adénosine exerce une activité principalement suppressive au niveau des fonctions de la plupart des cellules immunitaires via les récepteurs A2, principalement le récepteur A2a (**Figure 1.5**) (6). Le rôle régulateur du récepteur A2a est d’abord démontré dans la protection des tissus contre l’inflammation excessive chez la souris (102). De façon mécanistique, sur les lymphocytes T, l’adénosine nuit à la signalisation proximale du TCR via le récepteur A2a, tel que discuté dans la section 1.1.3.2 (103-105). En effet, l’adénosine inhibe la prolifération, la survie et la sécrétion de cytokines des lymphocytes T (106-111). Le récepteur A2a contribue également à l’épuisement

des lymphocytes T en favorisant l'expression de molécules immunorégulatrices telles que PD-1, LAG3, TIM3 ainsi que CTLA-4 sur les Tregs (112-115). De plus, l'adénosine nuit à la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules auxiliaires et favorise la polarisation des lymphocytes T CD4 en cellules T régulatrices (Tregs) via les récepteurs A2a et A2b (111, 113, 114, 116-118). Finalement, via le récepteur A2a, l'adénosine altère la survie et l'activation des lymphocytes B en inhibant le facteur de transcription NF- κ B en aval de la signalisation du récepteur des cellules B (BCR) (119). L'activation du récepteur A2a altère également la maturation et les fonctions effectrices des cellules NK (120, 121). En effet, l'adénosine diminue l'activité cytotoxique des cellules NK médiée par la production de cytokine (perforine, d'interféron gamma (IFN- γ)) et par l'expression du ligand Fas (122).

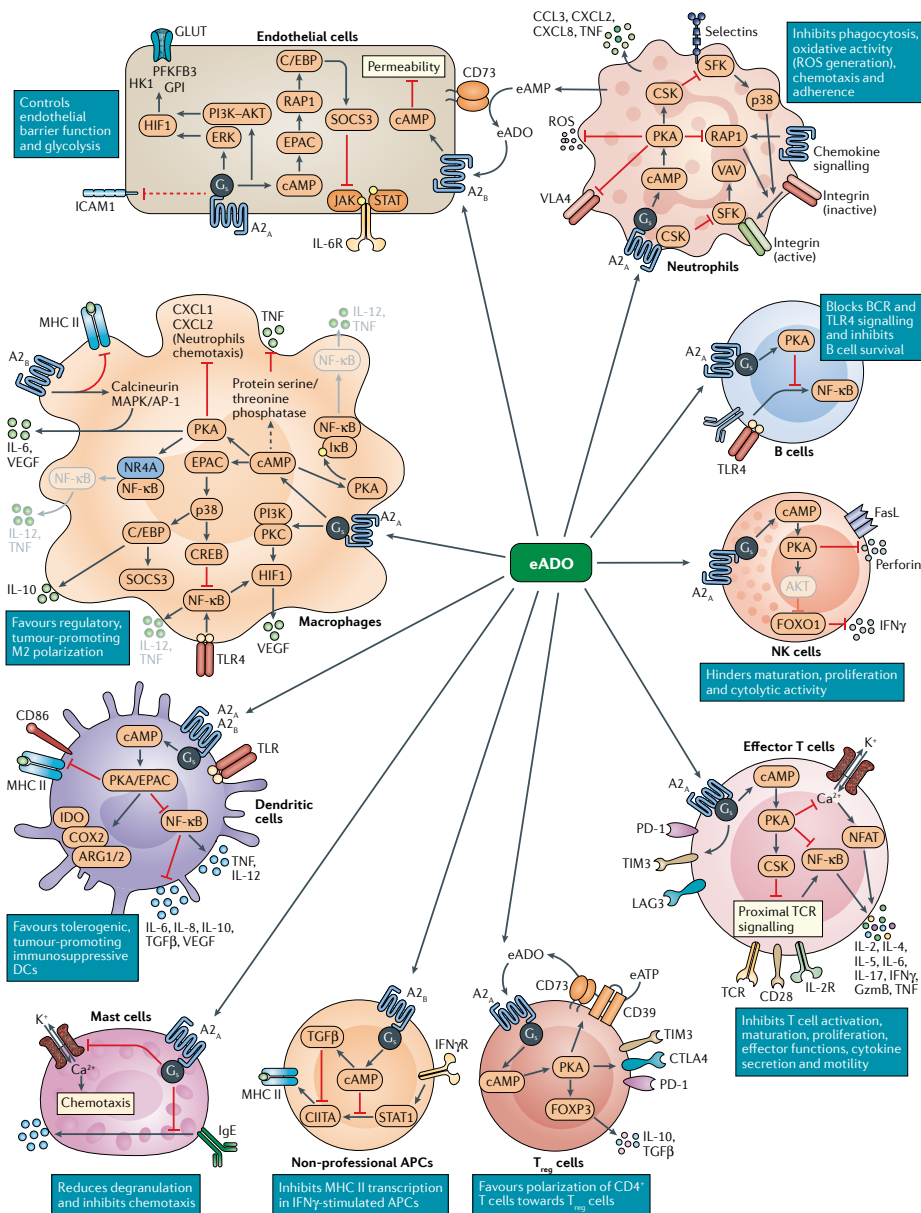


Figure 1.5 – Représentation graphique des activités biologiques exercées par la signalisation adénosinergique sur les cellules immunitaires et épithéliales. Les récepteurs A_{2a} et A_{2b} inhibent l'activité de diverses cellules immunitaires principalement via les voies de signalisation dépendantes de cAMP-PKA, de JAK-STAT ou de l'inhibition de NF-κB. Au niveau des cellules T, la signalisation A_{2a} inhibe l'activation, la prolifération et la sécrétion de cytokines ainsi que favorise la différenciation des lymphocytes T CD4 en Tregs. De plus, la signalisation adénosinergique inhibe (1) la dégranulation des mastocytes, (2) la phagocytose des neutrophiles, (3) la présentation antigénique des cellules dendritiques (DC), des macrophages et des cellules présentatrices d'antigène (APC) non-professionnelles, (4) la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF) en plus de (5) favoriser la production de facteurs tolérogéniques (IL-6, IL-10, TGFβ et VEGF). Finalement, la signalisation A_{2a} et A_{2b} induit une activité immunosuppressive indirect en limitant la migration leucocytaire. eADO=adénosine extracellulaire; eAMP=AMP extracellulaire; GzmB=granzyme B.

© Reproduit de Allard et al. Nat Rev Clin Oncol, 2020. Avec la permission de Springer Nature.

Au niveau des cellules myéloïdes, la signalisation des récepteurs A2 favorise la polarisation des macrophages vers l'acquisition d'un phénotype de type M2 associé avec la production des molécules immunosuppressives IL-10 et arginase-1 (123, 124). L'adénosine favorise également l'acquisition d'un profil régulateur des cellules dendritiques (*tolerogenic DCs*) via l'augmentation de la sécrétion de ces molécules immunosuppressives en plus de limiter leur production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12) et leur expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 (125-128). De plus, via la phosphorylation de STAT1 et la répression du facteur de transcription CIITA, le récepteur A2b diminue le niveau d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (MHC-II) sur les cellules présentatrices d'antigène non-professionnelles stimulées à l'IFN- γ (129, 130). L'expression du récepteur A2b sur les cellules hématopoïétiques favorise l'accumulation de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) dans le microenvironnement tumoral (131, 132). L'activation du récepteur A2a sur les cellules myéloïdes favorise aussi la croissance tumorale en supprimant l'activation des cellules NK et T cytotoxiques (133). Finalement, l'activation du récepteur A2a inhibe la capacité migratoire et de relâche d'espèce réactives d'oxygène (ROS) des neutrophiles ainsi que la dégranulation des mastocytes (92, 93, 134, 135).

1.1.3.4 Rôle des récepteurs A2 sur les cellules cancéreuses

L'activation des récepteurs A2 sur les cellules cancéreuses favorise la progression tumorale de diverses façons. D'abord, un rôle pro-prolifératif de l'activation du récepteur A2a a été rapporté dans une lignée du cancer du sein (136). L'activation du récepteur A2a favorise aussi le processus métastatique des cellules cancéreuses gastriques et hépatiques via l'engagement de la signalisation PI3K/Akt (137, 138). Alors que la signalisation intracellulaire des quatre récepteurs à l'adénosine peut coupler avec la signalisation des MAPK, seulement le récepteur A2b peut interagir avec les trois composantes des MAPK (ERK1/2, p38, JNK) (61). L'activation du récepteur A2b favorise ainsi la prolifération des cellules du cancer de la vessie, du sein, de la bouche, du côlon, de la prostate et du rein (139-145). Le récepteur A2b est également impliqué dans la motilité des cellules du cancer du sein via l'activation du facteur de transcription Fra-1 ainsi que via la phosphorylation de Rap1B qui limite sa localisation à la membrane et donc réduit l'adhésion cellulaire (146, 147). Conséquemment, l'activation de la signalisation A2b sur les cellules cancéreuses favorise le processus de dissémination métastatique (148, 149).

Alternativement, certaines études décrivent un rôle pro-apoptotique pour les récepteurs A2, notamment pour A2b sur les cellules du cancer de l'ovaire et A2a sur les cellules du cancer du côlon et du foie via l'activation de la caspase-3 (150-152). Par ailleurs, une importante étude rapporte que le récepteur A2b est impliqué dans l'apoptose médiée par le gène suppresseur de tumeur p53 (*TP53*) dans les cellules d'ostéosarcome humain (153). D'une part, p53 induit la transcription du gène *ADORA2B* qui encode pour le récepteur A2b en réponse à des stress cellulaires (153). D'autre part, l'activation du récepteur A2b favorise la mort cellulaire via l'augmentation de la protéine pro-apoptotique Puma et en diminuant les niveaux des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x1 et MCL-1 (153). De façon similaire, l'expression d'A2b est aussi régulée par la protéine p73 qui favorise l'apoptose dépendante des caspases, mais de façon indépendante de p53 (154).

1.1.3.5 Rôle des récepteurs A2 dans l'environnement tumoral

La signalisation des récepteurs A2 favorise également la progression tumorale via leur activation sur les cellules stromales non-cancéreuses retrouvées dans le microenvironnement tumoral. En effet, le récepteur A2a sur les cellules endothéliales est impliqué dans l'angiogenèse, notamment via la production de VEGF, ainsi que dans la lymphangiogenèse et la dissémination métastatique (62, 155-157). De façon similaire, l'activation du récepteur A2b est impliquée dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en favorisant la production des facteurs pro-angiogéniques TSP-1 et VEGF par les macrophages et les cellules endothéliales respectivement (132, 158-160). Enfin, le récepteur A2b sur les cellules endothéliales restreint la circulation des lymphocytes T vers les nœuds lymphatiques drainants des tumeurs (161).

Sur les fibroblastes associés aux cellules cancéreuses (CAFs), la signalisation du récepteur A2b favorise leur expression de CD73 dans le cancer colorectal et mène à l'accumulation d'adénosine dans le microenvironnement tumoral (162). De plus, le récepteur A2b favorise la production de facteurs pro-tumorigéniques tel que SDF-1 et bFGF par les CAFs dérivés du cancer du mélanome (163). Finalement, l'activation du récepteur A2a augmente la prolifération des CAFs de patients atteints du cancer du poumon non à petite cellules (NSCLC) (164).

1.1.3.6 Les récepteurs A2 comme cibles thérapeutiques

Le potentiel thérapeutique de l'inhibition ciblée des récepteurs A2, principalement via le rétablissement de l'immunité anti-tumorale, est d'abord démontré dans plusieurs modèles précliniques murins. En effet, l'absence de signalisation A2a ralentit la progression tumorale et métastatique en favorisant l'infiltration de cellules T CD8 et NK cytotoxiques, la production d'IFN- γ et en réduisant l'accumulation de Tregs dans plusieurs modèles de cancers murins (120, 165-167). Plusieurs études rapportent que l'inhibition du récepteur A2a offre une meilleure efficacité thérapeutique lorsque combinée à l'inhibition conjointe de PD-1/PD-L1 ou CTLA-4 (112, 168-172). En plus des points de contrôle immunologique, l'activité anti-tumorale de l'inhibition d'A2a est augmentée lorsque combinée à des thérapies ciblées telles que des inhibiteurs de BRAF, MEK et à un anticorps contre CD20 dans un modèle de lymphome (173-175). Enfin, l'inhibition du récepteur A2a augmente également l'efficacité thérapeutique des thérapies par transfert adoptif et des cellules T à récepteur chimérique (CAR T) (112, 165, 176, 177).

Quant au récepteur A2b, son antagonisme rétablit l'immunité anti-tumorale médiée par les lymphocytes T cytotoxiques d'une part en diminuant l'accumulation de MDSC et en favorisant l'activation des DCs et le recrutement de lymphocytes T via l'axe CXCR3 (140, 178). D'autre part, l'inhibition d'A2b ralentit la progression tumorale et métastatique en altérant la polarisation de Tregs (179). Enfin, en plus de rétablir l'activité immunitaire anti-tumorale, l'inhibition du récepteur A2b nuit également à la progression cancéreuse via son rôle pro-tumorigénique intrinsèque sur les cellules cancéreuses. En effet, contrairement au récepteur A2a, une étude rapporte une activité anti-métastatique de l'inhibition d'A2b indépendante de l'activité cytotoxique des cellules NK (167). Étant donné leurs fonctions non-redondantes, une molécule qui inhibe conjointement les récepteurs A2a et A2b a été développée et est actuellement testée en essais cliniques malgré le manque de données précliniques (6, 180).

Finalement, il est possible que l'inhibition prolongée du récepteur A2a engendre un effet à double tranchant non-désirable et requiert une attention particulière en essais cliniques. En effet, l'activation du récepteur A2a protège aussi les lymphocytes T de la mort cellulaire induite par leur activation (AICD) (181, 182). L'ablation de l'expression d'A2a spécifiquement dans les

lymphocytes T révèle que celui-ci est requis à la survie des cellules T lorsqu'activées pendant une période prolongée (183). Conséquemment, alors que l'inhibition d'A2a favorise initialement le contrôle immunitaire anti-tumoral tel que décrit précédemment, la reprise tumorale est accélérée dans les souris déficientes pour A2a dans deux modèles de cancer murin à cause d'une diminution de la persistance des cellules T CD8 infiltrant les tumeurs (183).

1.1.4 CD73

CD73 est une protéine homodimérique d'un poids moléculaire de 60-80 kDa encodée par le gène *NT5E*. Plus précisément, CD73 est une 5'-nucléotidase extracellulaire (ecto-5'-nucléotidase) ancrée dans les membranes cellulaires via un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) (184). Une forme soluble de CD73 (sCD73) peut également être retrouvée dans le sérum et les liquides séminaux et synoviaux suivant le clivage protéolytique de la forme membranaire (49, 185-191). La structure cristallographique de CD73 révèle trois domaines structurels; le domaine N-terminal qui contient les sites d'attachement des ions zinc (résidus 27-317), le domaine C-terminal qui contient le site de reconnaissance des substrats (résidus 337-549) ainsi qu'une région charnière qui relie les domaines N- et C- terminaux (résidus 318-336) et qui permet ainsi à l'enzyme de permuter entre les conformations ouverte et fermée (**Figure 1.6**) (192). Le changement de conformation est requis à l'activité enzymatique de CD73 pour permettre l'attachement du substrat et le relâchement du produit (192). Trois mutations qui résultent en une perte de fonction ou d'expression de CD73 ont été identifiées dans 9 patients atteints de calcifications artérielles au niveau des jointures articulaires et extrémités des membres, une manifestation clinique appelée ACDC (193). De façon mécanistique, les trois mutations identifiées altèrent le déplacement de l'enzyme jusqu'à la membrane cellulaire (194). La calcification observée chez les patients atteints d'ACDC s'explique par une augmentation compensatoire de TNAP qui résulte en un déséquilibre des phosphates inorganiques (29).

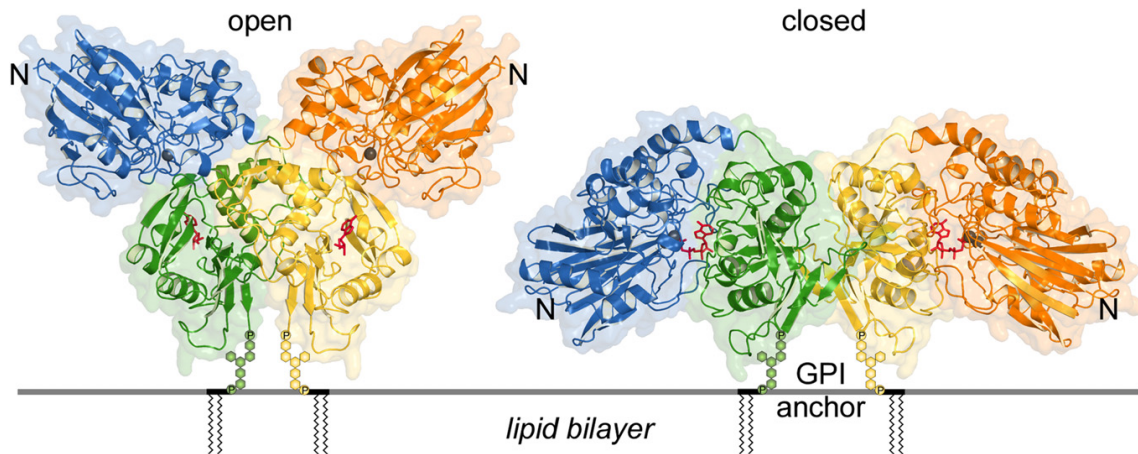


Figure 1.6 – Structure cristalline de l’enzyme CD73 humaine, sous forme membranaire ancrée via un GPI (groupe glycosylphosphatidylinositol), en conformation ouverte (*open*) et fermée (*closed*). *Lipid bilayer*=bicouche lipidique. N=domaine N-terminal.

© Reproduit de Knapp et al. Cell Structure, 2012. Avec la permission de Elsevier.

1.1.4.1 Régulation de l’expression de CD73

L’expression de CD73 est régulée par plusieurs facteurs environnementaux et voies de signalisation. L’hypoxie, via HIF-1 α , est sans doute le facteur le plus important à la régulation de l’expression de CD73 dans le microenvironnement tumoral (6, 38). Ensuite, plusieurs cytokines ou molécules inflammatoires ont démontré un effet de régulation positive de l’expression de CD73 sur divers types cellulaires, notamment l’IL-2 et l’IL-21 sur les Tregs (195, 196), la prostaglandine E2 (PGE2) sur les lymphocytes (197), les interférons de type I (IFN- α et IFN- β) sur les cellules endothéliales (198, 199), le TGF- β sur les lymphocytes T et les MDSC (200-203) et l’IL-6 sur les lymphocytes Th17 (201). De plus, certaines voies de signalisation oncogéniques telles Wnt/ β -caténine (204) et la signalisation des MAPK (173, 205) ainsi que certaines drogues cytotoxiques de type platine (206) et anthracycline (207) augmentent l’expression de CD73 sur les cellules cancéreuses. À l’inverse, la signalisation médiée par les récepteurs à l’estrogène diminue son expression dans le cancer du sein (208). Par ailleurs, l’expression élevée de CD73 a été rapportée comme étant associée à des mutations oncogéniques concernant les gènes *TP53*, *KRAS*, *HRAS*, *BRAF* et *EGFR* dans les cancers du sein, du poumon, de l’ovaire, du côlon et le mélanome (173, 209-213). Deux études ont aussi rapporté un rôle de l’adénosine dans la régulation positive de l’expression de CD73 sur les cellules endothéliales et Tregs (214, 215). Enfin, la transcription génique de CD73 dans les cellules cancéreuses est aussi sous le contrôle de micro-ARN tel que

miR-30a (216-218) et miR-422a (219) ainsi que via la méthylation des îlots CpG du gène *NT5E* (220, 221).

1.1.4.2 Rôle de CD73 dans l'immunité anti-tumorale

Le rôle négatif de CD73 dans l'immunité anti-tumorale est largement démontré dans des modèles précliniques de cancer de souris génétiquement déficientes pour CD73. D'abord, dans un modèle de fibrosarcomes spontanés induit par le méthylcholanthrène (MCA), les souris déficientes pour CD73 présentent un développement de tumeurs réduit et une survie prolongée (222). Cette étude phare rapporte que l'effet protecteur de l'absence de CD73 est dépendant de la présence de lymphocytes T CD8, de cellules NK et de l'IFN- γ (222). Des résultats similaires ont été observés dans un modèle transgénique de souris qui développent des cancers spontanés de la prostate (TRAMP) (222). L'absence de CD73 dans les souris favorise le contrôle immunitaire principalement médié par les cellules T CD8 et l'IFN- γ , dans plusieurs modèles murins syngéniques de croissance tumorale sous-cutanée dont le cancer du côlon (MC38), du lymphome (EG7), du sein (AT-3), de fibrosarcome (MCA), de la prostate (TRAMP-C1), de l'ovaire (ID8) et le mélanome (B16), (176, 222-226). Les souris déficientes pour CD73 démontrent un meilleur contrôle de la dissémination métastatique médié en partie par les cellules NK dans des modèles murins de métastases spontanées et induites (222, 223). De façon consistante, l'adénosine produite par les cellules humaines du cancer de l'ovaire via CD73 inhibe l'activité cytotoxique médiée par les cellules T et NK (227, 228). Finalement, une étude rapporte un rôle pro-tumorigénique de CD73 en limitant le recrutement de lymphocyte B dans un modèle murin de mélanome (229).

De façon intéressante, quelques études rapportent un meilleur contrôle tumoral lorsque CD73 est absent de l'hôte et lorsqu'il est neutralisé sur les cellules cancéreuses (222, 223, 226). Plus précisément, CD73 sur les cellules cancéreuses limite, d'une part, l'infiltration de lymphocytes T anti-tumoraux et inhibe d'autre part l'immunité anti-tumorale via son expression sur les cellules hématopoïétiques (226). De plus, l'absence de CD73 sur les CAFs améliore le contrôle immunitaire anti-tumoral dans un modèle murin de co-injection de cellules cancéreuses d'ovaires et de fibroblastes (230).

1.1.4.3 Rôle de CD73 sur les cellules T régulatrices

Une importante part du rôle pro-tumorigénique de CD73 depuis le compartiment hématopoïétique est attribuée à son expression sur les Tregs. En plus de l'expression constitutive de CD73, les Tregs de souris expriment CD39 et constituent donc une source importante de production d'adénosine (231, 232). Les Tregs isolées de souris déficientes pour CD73 ou CD39 inhibent la prolifération des cellules T conventionnelles moins efficacement que les cellules Tregs pourvues de ces nucléotidases (223, 231, 233, 234). De plus, l'expression de CD73 ou CD39 sur les Tregs facilite la progression tumorale et la dissémination métastatique dans plusieurs modèles de souris (223, 226, 234). En raison de leur système de défense antioxydant faiblement efficace et de l'important stress oxydatif présent dans le microenvironnement tumoral, une large portion de Tregs apoptotiques présents dans les tumeurs contribue à l'accumulation d'adénosine via l'expression de CD39 et CD73 et le largage important d'ATP par apoptose (235).

Finalement, contrairement aux Tregs de souris, CD73 n'est pas constitutivement exprimé à la surface des Tregs humains, mais est plutôt enrichi au niveau intracellulaire et induit suivant l'activation des Tregs par l'IL-2, notamment (195, 232, 236, 237). Néanmoins, en accord avec un rôle biologique pertinent de CD73 sur ces cellules, l'inhibition de CD73 réduit l'activité suppressive des Tregs humains (232). De plus, une importante population de cellules Tregs qui expriment CD73 et qui démontrent une grande activité suppressive est rapportée dans les ascites de patientes atteintes du cancer de l'ovaire (238). Toutefois, les mutations de CD73 découvertes chez les patients atteints de l'ACDC ne les prédisposent pas à des troubles auto-immuns (193) suggérant ainsi que la compréhension du rôle de CD73 sur les Tregs humains demeure incomplète.

1.1.4.4 Rôle de CD73 sur les cellules cancéreuses

L'expression de CD73 est souvent plus élevée sur les cellules cancéreuses que dans les tissus normaux (**Figure 1.3**) et son rôle pro-tumorigénique ne se limite pas qu'à l'inhibition de l'immunité anti-tumorale via la génération d'adénosine dans le microenvironnement tumoral. D'abord, plusieurs études révèlent une activité pro-angiogénique *in vitro* et *in vivo* de CD73 via son rôle dans la migration et l'adhérence des cellules cancéreuses, de façon indépendante de la signalisation adénosinergique (225, 239, 240). Aussi, l'expression de CD73 dans le mélanome

humain est associée à un phénotype invasif et à des marqueurs métastatiques (241) et régule la prolifération *in vitro* et *in vivo* ainsi que la chimiorésistance de cellules de glioblastome (242-245).

Plusieurs études suggèrent que l'expression de CD73 est particulièrement importante dans la biologie du cancer du sein triple négatif (TNBC). Le TNBC, caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs à l'estrogène (ER), à la progestérone (PR) et HER2, est le sous-type de cancer du sein le plus agressif et présente un défi thérapeutique actuel (246-248). *NT5E* est l'un des gènes les plus surexprimés dans les métastases du TNBC (249, 250). De plus, l'expression de CD73 est dynamiquement positivement régulée par la doxorubicine et est associée à un mauvais pronostic ainsi qu'à la résistance aux anthracyclines (207). Plus encore, plusieurs études rapportent que l'inhibition ou l'absence d'expression de CD73 ralentissent la progression tumorale des xénogreffes cellulaires humaines de TNBC (MDA-MB-231) dans des souris immuno-déficientes (251-254). Le ralentissement de la croissance des tumeurs déficientes pour CD73 dans les souris immuno-compromises suggère que l'ecto-nucléotidase est essentielle à la progression tumorale indépendamment de son activité immunosuppressive (255). L'activité pro-tumorigénique de CD73 sur les cellules du TNBC est variée et n'est pas complètement comprise, mais certaines études y décrivent des rôles intrinsèques dans l'adhésion et la migration (254, 256, 257), dans la viabilité cellulaire (252, 253), dans la régulation de l'expression du récepteur EGFR (254, 257, 258), dans l'angiogenèse via la production de VEGF (240, 252) ainsi que dans la dissémination métastatique via le récepteur A2b (147).

1.1.4.5 Rôle de CD73 dans la transition épithélio-mésenchymateuse et les cellules souches

CD73 joue un rôle important dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un processus associé à la dissémination métastatique et à la résistance aux thérapies anti-cancéreuses (259). D'abord, l'expression de CD73 sur les cellules cancéreuses est associée avec les signatures génétiques de l'EMT et est augmentée via le TGF- β , la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et le facteur de transcription TWIST qui sont tous connus pour favoriser l'EMT (204, 230, 260-262). Via CD73, l'EMT favorise la production d'adénosine dans le microenvironnement tumoral qui en retour contribue à l'EMT et au caractère souche des cellules cancéreuses, notamment via le récepteur A2a impliqué dans la régulation de SOX9 dans le cancer du foie et dans l'activation de β -caténine dans le cancer gastrique (138, 263-267). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression du

récepteur A2b en réponse à l'hypoxie favorise l'enrichissement des cellules souches initiatrices cancéreuses (CSC) dans des modèles du cancer du sein et de glioblastome (268, 269). L'expression élevée de CD73 caractérise plusieurs populations de CSC dans les cancers du sein, du rein et du pancréas (270-272). Finalement, l'expression de CD73 est aussi retrouvée élevée dans une population de lymphocytes T CD8 mémoire qui présentent des caractéristiques de cellules souches et dont l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), un marqueur typique de CSC, est élevée (273).

1.1.4.6 Fonctions indépendantes de l'adénosine et signalisation intracellulaire

De façon indépendante de son activité enzymatique et de la production d'adénosine, CD73 favorise l'adhésion et l'invasion des cellules cancéreuses en interagissant avec des composantes de la matrice extracellulaire telles que la ténascine C (274, 275). CD73 ne possède pas de domaine transmembranaire et ne peut induire de signalisation intracellulaire directement suivant l'interaction avec un ligand. Par contre, étant donné sa localisation membranaire via des groupements GPI enrichis dans des radeaux lipidiques, il est possible qu'un regroupement de protéines CD73 puisse initier une signalisation via la trans-activation de tyrosine kinases co-localisées au niveau intracellulaire (276, 277). Dans ce sens, CD73 favorise alors que l'adénosine inhibe la prolifération des cellules cancéreuses cervicales suggérant ainsi un rôle intrinsèque pro-tumorigénique de CD73 indépendant de son activité enzymatique (278). Surtout, il a été observé que CD73 peut contribuer à la signalisation intracellulaire impliquant la kinase Akt et médiée par les récepteurs EGFR et TNFR2 (278, 279).

1.1.4.7 CD73 comme cible thérapeutique

Alors que les études qui démontrent l'accumulation d'adénosine immunosuppressive dans le microenvironnement tumoral datent de plus de 20 ans (26, 280, 281), le potentiel thérapeutique de cibler l'enzyme CD73 comme traitement anti-cancéreux est montré pour la première fois en 2010 (148). L'efficacité thérapeutique issue de l'inhibition de CD73 est ensuite démontrée dans plusieurs modèles de croissance tumorale sous-cutané et de dissémination métastatique en monothérapie (223, 225, 226, 229), ou en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques (207), avec la radiothérapie (282), avec des thérapies ciblées telles qu'un anticorps dirigé contre HER2 (261), avec des inhibiteurs de points de contrôles immunologiques tels que PD-1 et CTLA-

4 (115, 282) ainsi qu'avec des anticorps agonistiques dirigés vers 4-1BB, OX40 et GITR (283). Finalement, quelques études rapportent également une activité thérapeutique bonifiée lorsque l'inhibition de CD73 est combinée à l'inhibition du récepteur A2a (138, 284).

1.1.5 CD39 et CD38

L'ATP agit comme signal de danger qui favorise le recrutement de cellules phagocytiques et les réponses pro-inflammatoires via l'activation de l'inflammasome (285). Conséquemment avec un rôle de l'inflammasome dans la fonctionnalité des lymphocytes T, l'inhibition des points de contrôles immunologiques PD-1 et CTLA-4 permet un moins bon contrôle anti-tumoral chez les souris déficientes pour les protéines NRLP3 (*Nrlp3^{-/-}*) et caspase-1 (*Casp1/11^{-/-}*) impliquées dans la signalisation de l'inflammasome (286). Tout comme l'ATP, le NAD⁺ extracellulaire agit comme signal de danger qui favorise les réponses inflammatoires, notamment via l'activation du récepteur purinergique P2Y11 (287). Alternativement, le NAD⁺ influence l'activité de diverses cellules immunitaires, notamment les Tregs, via l'activité enzymatique des mono-ADP-ribosyltransférases (ARTs) responsables de la ribosylation de protéines dont le récepteur purinergique P2X7 (288, 289). De par leur activité catalytique envers l'ATP et le NAD⁺ respectivement, les enzymes CD39 et CD38 jouent un rôle important dans la régulation de l'immunité anti-tumorale (290, 291).

1.1.5.1 Structure et régulation de l'expression de CD39 et CD38

Tout comme CD73, l'expression de CD39 est favorisée par le microenvironnement tumoral via l'hypoxie (HIF-1 α) et la chimiothérapie (38, 207). De plus, sur les Tregs, l'expression de CD39 est régulée à la hausse via l'IL-27, le TGF- β et l'IL-2 (195, 292, 293). Finalement, la production de kynurénine par les cellules cancéreuses et l'activation subséquente du récepteur AHR sur les macrophages augmente leur expression de CD39 (294).

CD38 est une glycoprotéine transmembranaire à activité glycohydrolase qui favorise la synthèse d'ADP ribose cyclique (cADPR) depuis le NAD⁺ (295). En plus de son activité enzymatique, CD38 agit comme récepteur qui permet la transduction de signalisation intracellulaire sur certaines cellules telles que les lymphocytes (296). CD38 est largement exprimé sur les cellules hématopoïétiques et son expression a été rapportée comme étant régulée par diverse

cytokines telles que l'IL-1 β , le TNF- α , l'IFN- γ , l'IFN- β ainsi que par l'acide rétinoïde, la signalisation des récepteurs à l'estrogène, la voie PI3K et le vieillissement à travers une grande variété de types cellulaires (172, 297-302).

1.1.5.2 Rôle de CD39 dans l'immunité anti-tumorale et le cancer

D'abord, la surexpression de CD39 accélère la progression tumorale dans un modèle métastatique de cancer colorectal murin (303). De plus, l'absence de CD39 sur les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques altère la dissémination métastatique chez la souris, notamment via l'activité suppressive des Tregs sur l'immunité anti-tumorale médiée par les cellules NK (234, 304). En effet, CD39 joue un rôle important dans l'activité suppressive des Tregs (305). Une faible quantité de Tregs circulants qui expriment CD39 est d'ailleurs associée à une meilleure survie sans rechute chez les patients atteints de mélanome sous thérapie anti-CTLA-4 (306). De plus, l'inhibition de CD39 nuit à l'accumulation de Tregs tumoraux notamment en altérant la signalisation dépendante de l'ATP via le récepteur P2X7 (307-309). Enfin, ont également été décrits des rôles de CD39 dans la maturation et l'activité inflammatoire des macrophages (310, 311), dans l'épuisement des lymphocytes T (312, 313), dans l'activité immunosuppressive de certaines cellules T auxiliaires Th17 (200, 314), dans l'inefficacité des cellules NK à contrôler la dissémination métastatique (304), dans la présentation antigénique médiée par les DCs (315, 316), dans l'activité migratoire des neutrophiles (92) ainsi que dans l'activité pro-tumorigénique des MDSC en coopération avec CD73 (317, 318) (**Figure 1.7**). Enfin, en plus de son rôle dans l'immunité anti-tumorale, l'activité hydrolase de CD39 annule l'effet inhibiteur de l'ATP sur la prolifération des cellules du cancer du mélanome (B16) (319). Tout comme CD73, CD39 et CD38 sont impliqués dans l'angiogenèse via divers mécanismes dont l'adhésion des cellules endothéliales et la production de VEGF (234, 319-323).

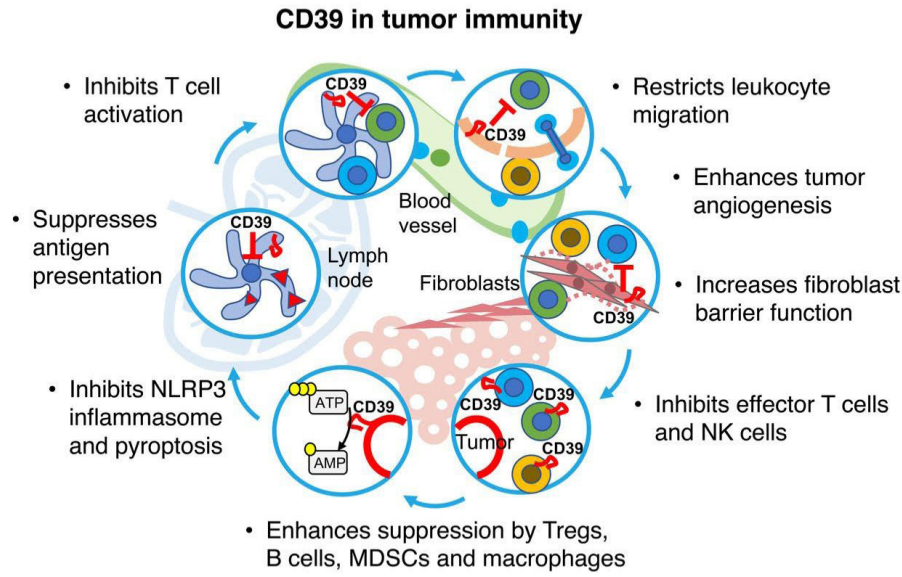


Figure 1.7 – Rôle de l’enzyme CD39 dans l’immunité anti-tumorale. L’expression de CD39 dans le microenvironnement tumoral influence l’immunité tumorale de diverses façons. CD39 inhibe (1) l’activation de l’inflammasome via le récepteur P2X7, (2) la mort cellulaire immunogénique et la présentation antigénique par les cellules dendritiques et (3) l’activité de costimulation de l’ATP durant l’activation des lymphocytes T. De plus, CD39 favorise (4) la diapédèse des cellules immunitaires et (5) l’angiogénèse. Enfin, (6) l’activité de CD39 est associée avec la présence de cellules T et NK dysfonctionnelles, de macrophage M2, Tregs et MDSC.

© Reproduit de Allard et al. JITC, 2019. Avec la permission de BMJ.

1.1.5.3 Rôle de CD38 dans l’immunité anti-tumorale et le cancer

Quant à CD38, son rôle immuno-régulateur a été rapporté sur les lymphocytes T (324), les cellules dendritiques (325, 326), les Tregs (327, 328) et les lymphocytes B régulateurs (Bregs) (329, 330). L’expression de CD38 sur les cellules cancéreuses du mélanome a été décrite comme étant capable d’inhiber la prolifération des lymphocytes T via la production d’adénosine (331). En effet, une importante étude récente démontre que son expression sur les cellules cancéreuses joue un rôle dans le développement de résistance à la thérapie anti-PD-1 via la production d’adénosine et la suppression de l’immunité anti-tumorale médiée par les cellules T CD8 (172).

1.1.5.4 La production d’adénosine via les vésicules extracellulaires

Par ailleurs, les cellules cancéreuses peuvent nuire à l’immunité anti-tumorale via la production de vésicules extracellulaires qui contribuent à la génération d’adénosine (332, 333). En effet, la production d’exosomes qui expriment CD39 ou CD73 ou CD38 à leur surface est décrite pour plusieurs types de cancers dont celui du myélome multiple, de la prostate, de la tête et du cou

et du neuroblastome (333-336). La production de telles vésicules extracellulaires immunosuppressives qui expriment CD73 et CD39 peut également provenir de lymphocytes B via le facteur de transcription HIF-1 α (337).

1.1.5.5 CD39 et CD38 comme cibles thérapeutiques

L'inhibition de CD39 ralentit la progression tumorale et la dissémination métastatique de plusieurs modèles précliniques, notamment des cancers murins du côlon (MC38) (234), du mélanome (B16, LWT1) (234, 304), du rein (RENCA) (304) et de xénogreffes de sarcomes de patients humains (338). L'activité thérapeutique de l'inhibition de CD39 est augmentée lorsque combinée à l'inhibition des points de contrôle immunologique PD-1 et CTLA-4 (304, 307, 339, 340), à l'IL-2 (304), à des thérapies ciblées telles que des inhibiteurs de BRAF et MEK (304) et à la chimiothérapie immunogénique (339, 341). De façon mécanistique, en plus de nuire à la production d'adénosine, l'inhibition de CD39 augmente l'immunité anti-tumorale via l'augmentation des niveaux d'ATP et l'activation de l'inflammasome (340). En effet, via la dégradation de l'ATP, l'enzyme CD39 inhibe l'activité thérapeutique de la chimiothérapie qui induit la mort cellulaire immunogénique (341).

En ce qui concerne CD38, l'étendue de son activité biologique ne se résout pas qu'à son rôle dans la voie alternative de production d'adénosine. Notamment, son expression élevée et son rôle dans la survie et la prolifération des cellules cancéreuses de plusieurs types de cancers hématologiques tels que le myélome multiple, les lymphomes non-hodgkiniens et la leucémie lymphoïde chronique font de CD38 une cible thérapeutique intéressante (296, 342). Le potentiel thérapeutique de cibler CD38 dans les cancers épithéliaux est aussi démontré dans quelques modèles précliniques de cancers murins dont celui du poumon et du gliome (343-345). Enfin, via son rôle dans la production d'adénosine, l'inhibition de CD38 augmente l'immunité anti-tumorale, le contrôle tumoral et permet de surmonter la résistance acquise à l'inhibition de PD-1 dans plusieurs modèles précliniques (172).

1.1.6 Valeur pronostique des composantes de l'axe adénosinergique en cancer

Tel que décrit précédemment, l'axe adénosinergique est impliqué dans la progression tumorale via divers mécanismes. Plus particulièrement, les différentes enzymes impliquées dans

la dégradation de l'ATP en adénosine extracellulaire contribuent grandement à la création d'un microenvironnement tumoral hostile à l'immunité anti-tumorale. De plus, CD73 et l'adénosine régulent conjointement et indépendamment plusieurs fonctions pro-tumorigéniques intrinsèques aux cellules cancéreuses. Plusieurs études se sont donc intéressées à la valeur pronostique des différents acteurs de l'axe adénoenergique dans différents contextes tumoraux et sont résumées dans le tableau 1.1. De façon générale, l'axe adénoenergique est associé à un mauvais pronostic. En effet, en dérivant une signature génique qui capture la signalisation adénoenergique, une récente étude rapporte un consensus généralement défavorable au pronostic de l'adénosine dans divers contextes tumoraux (346).

1.1.6.1 Valeur pronostique des récepteurs à l'adénosine

À cause du manque d'anticorps validés pour la détection des récepteurs à l'adénosine, très peu d'études ont évalué la valeur pronostique de ces récepteurs dans les cancers humains. Néanmoins, alors qu'une étude rapporte un pronostic favorable à l'expression de A2a dans le cancer du poumon, l'expression élevée des récepteurs A2a et A2b est généralement associée à un mauvais pronostic, notamment chez les patients atteints de cancers gastriques, colorectaux, de la vessie et du sein (137, 139, 211, 347, 348). Les surexpressions des gènes *ADORA2A*, *ADORA2B* et *ADORA3* sont notamment associées à des mauvais pronostics dans les cancers du foie, du sein et de la tête et du cou (149, 349-351).

1.1.6.2 Valeur pronostique de CD73, CD38 et CD39

L'expression élevée de CD73 est fréquemment rapportée dans plusieurs tissus tumoraux et est généralement associée à un mauvais pronostic (**tableau 1.1**) (6, 184). Sa valeur pronostique est la plus étudiée et la plus robuste de toutes les composantes de l'axe adénoenergique et lui confère un intérêt thérapeutique certain. De façon intéressante, CD38 est un puissant prédicteur de mauvais pronostic dans la leucémie lymphoïde chronique, mais est associée à un pronostic favorable dans le cancer du pancréas et lorsqu'exprimé sur les macrophages infiltrant les tumeurs pancréatiques (352-355). Étant donné un éventail de fonctions variées, il est possible cependant que l'implication de CD38 dans l'axe adénoenergique varie d'un contexte à l'autre. Enfin, les quelques études qui se sont intéressées au potentiel prédicteur de CD39 y rapportent une valeur essentiellement défavorable (**tableau 1.1**).

1.1.7 Synthèse du chapitre

En résumé, l'axe adénosinergique est composé de plusieurs molécules (ATP, NAD⁺, cADPR, ADP, AMP, adénosine, inosine), enzymes (CD39, CD38, CD203a, CD73, PAP, TNAP, ADK, AK, ADA), récepteurs (P2X, P2Y, A1, A2, A3), transporteurs (Canx, Panx, ENTs, CNTs) et est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques. Plus particulièrement, CD73 joue un rôle central dans la production d'adénosine immunosuppressive, dans la progression tumorale et est une cible thérapeutique intéressante afin de rétablir l'immunité anti-tumorale. Plusieurs essais cliniques ciblant divers acteurs de l'axe adénosinergique, dont CD73, sont d'ailleurs en cours.

TABLE 1. Valeur pronostique des composantes de l'axe adéno-nergique dans les cancers humains

Cancers du tract gastro-intestinal	Nb pts	Prot./Gène	Expression tumorale (vs Normal)		Valeur pronostique	Référence
			Expression tumorale	(vs Normal)		
Estomac	68	CD73	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)	Lu, 2013
	84	CD39	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)	Cai, 2015
	101	CD39	Surexpression		Mauvais pronostique après chirurgie (SG)	Cai, 2016
	546	CD73	Surexpression		Expression associée avec la taille tumorale, le stade, l'infiltration veineuse/lymphatique et les métastases aux nœuds lymphatiques	Nunakura, 2019
	37	A2 _μ	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)	Shi, 2019
	366	NT5E	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)	Xu, 2020
Vésicule biliaire	108	CD73	Surexpression		Marqueur de progression. Mauvais pronostique (SG)	Xiang, 2014
Foe-vésicule biliaire-pancréas	324	CD39	Surexpression		Mauvais pronostique (récurance après chirurgie, SG)	Cai, 2016
	422	NT5E	Surexpression		Mauvais pronostique (SSR)	Shrestha, 2018
	189	CD73	Surexpression		Mauvais pronostique (TPT, SG)	Ma, 2019
	365	ENTPD1	Surexpression		Expression sur les TILs associée à un mauvais pronostique (SG)	Liao, 2020
		ADORA2B	Surexpression		Mauvais pronostique (récurance après chirurgie, SG)	Mia, 2020
Variés	66	CD38	Surexpression		Meilleure valeur pronostique lorsque combiné avec l'expression de SOX9 (pire pronostique pour CD73+ SOX9+)	Lam, 2019
	145	CD73	Surexpression		Macrophages (CD68+) infiltrant CD38+ associés à un bon pronostique (SSM, SG)	Sciarrà, 2019
		28	ENTPD1	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)
Pancréas	114	CD73	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)	Zhou, 2019
Adénocarcinome ductulaire	90	CD73	Surexpression tumorale		Mauvais pronostique (SG)	Zhang, 2015
Colorectal	90	CD39	Surexpression stomale		Bon pronostique (SG)	Zhang, 2015
Adénocarcinome rectal	223	CD73	Surexpression		Bon pronostique (SG). Expression inversement associée au stade	Wu, 2012
CCR	204	A2 _μ	Surexpression		Meilleure valeur pronostique lorsque combiné avec l'expression de CD73 (CD73+ CD39- & CD73- CD39+ associé au pire et meilleur pronostique respectivement)	Wu, 2019
	557	NT5E	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)	Yu, 2020
	215	ENTPD1	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)	Toungas, 2019
CCC métastatique	136	CD73	Surexpression		Variant génétique (allele C) associé à un mauvais pronostique (SG) chez les patients traités au Bevacizumab+chimiothérapie	Ono, 2018
Neuroendocrinien					Expression associée au stade. Marqueur potentiel de réponse à la thérapie anti-PD-1	
Gastro-intestinal						
Cancers gynécologiques						
Sein						
Triple négatif	6,209	NT5E	Surexpression		Mauvais pronostique (SG). Expression associée à la résistance aux anthracyclines	Lu, 2013
	4,189	ADORA2B	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)	Millet, 2016
	122	CD73	Surexpression		Mauvais pronostique (SSM, SG)	Bussiere, 2018
	66	A2 _μ	Surexpression		Mauvais pronostique (SSM, SG)	Horigome, 2018
	1,466	NT5E	Surexpression		Pas de valeur pronostique	Zh, 2012
ER+	476	NT5E	Surexpression		Bon pronostique (SSR)	Supernat, 2012
ER-	136	CD73	Surexpression		Bon pronostique (SSM, SG)	Lo Nigro, 2012
Tous types	256	NT5E	Régulation épigénétique (sous-exp/normal/ surexpression)		Méthylation des îlots CpG du gène NT5E associée à un bon pronostique (SSM, SG, potentiel métastatique)	
Ovaire						
HGS	285	CD73	Surexpression		Mauvais pronostique (SSM, SG)	Turcotte, 2015
Carcinome épithélial	167	CD73	Surexpression		Bon pronostique (SG)	Ou, 2012
Endométrioïde	47	NT5E	Sous-expression		Bon pronostique (SG)	Bawzer, 2016
Cancers urologiques						
Rein						
Carcinome rénal	159	CD73	Surexpression		Expression associée avec le type tumoral, grade tumoral et le stade métastatique	Yu, 2015
	367	CD39	Surexpression		Mauvais pronostique (SG)	Wu, 2020
Vessie						
Carcinome urothélial non-infiltrant et infiltrant le muscle	174	CD73	Surexpression		Bon pronostique (SGP)	Whitson, 2015
	270	CD73	Surexpression		Expression tumorale associée à un bon pronostique (non-infiltrant-SSP, infiltrant=SG)	Kovats, 2019
	160	A2 _μ	Surexpression		Expression stromale associée à un mauvais pronostique (non-infiltrant=SSP)	Zhou, 2017
P prostate						
	116	CD73	Surexpression		Marqueur de métastases aux nœuds lymphatiques	Yang, 2013
	285	CD73	Surexpression		Expression dans l'épithélium normal adjaçant associée à un mauvais pronostique (SSRB, SSMT)	Leider, 2016
	218	CD38	Surexpression		Expression stromale associée à un bon pronostique (SSRB)	Lu, 2016

TABLE 1. Valeur pronostique des composantes de l'axe adénoïnergique dans les cancers humains (suite)

Autres cancers		Valeur pronostique		Référence
Nb pts	Prot./Gène	Expression tumorale (vs Normal)		
Cancers du cerveau				
Glioblastome				
500	MT5E	Mauvais pronostique (SSM)		Xu, 2013
166	MT5E	Surexpression	Mauvais pronostique (SSM, SG)	Wang, 2019
Cancers de la thyroïde				
Carcinome papillaire				
30	MT5E	Surexpression	Expression associée à la taille tumorale et statut métastatique	Sarraf-Berini, 2019
Cancers du poumon				
642	CD73	*surexpression chez les patients avec EGFR muté et les femmes	Mauvais pronostique (SSR, SG)	
642	A2A	*surexpression chez les patients avec EGFR muté et les femmes	Bon pronostique (SSR, SG)	Inoue, 2017
Cancers du cou et tête				
Carcinome de cellules squameuses				
294	ADORA2A		Mauvais pronostique (potentiel métastatique)	Riccards, 2014
65	CD39		Expression associée au stade. Mauvais pronostique (SG)	Mandapathi, 2018
65	CD73		Expression associée au stade tumoral. Mauvais pronostique (SG)	Mandapathi, 2018
279	MT5E	Régulation épigénétique (sous-segmenté lorsque méthylé)	Hypométhylation des îlots CpG du gène MT5E associée à un mauvais pronostique (SG) dans les tumeurs VPH+ Hypométhylation des îlots CpG du gène MT5E associée à un bon pronostique (SG) dans les tumeurs VPH- Hypométhylation des îlots CpG du gène ADORA2A associée à un mauvais pronostique (SG)	Vogt, 2018
Cancers hématologiques				
LLC				
134	CD73	Surexpression	Mauvais pronostique (SG après chirurgie)	Dang, 2018
260	MT5E		Mauvais pronostique (SG)	
Cancers hématologiques				
270	MT5E	Surexpression	Marqueur de maladie minimale résiduelle	Cosian-Smith, 2011
37	CD38		Mauvais pronostique (OS) *Première étude	Damle, 1999
4071	CD38		Mauvais pronostique (SG, SSP, TPT) *revue de 31 études entre 1999-2008 cumulant 4071 patients	Van Boeckstaël, 2009
299	CD73		Marqueur de maladie agressive	Sera, 2011
34	CD39		Expression corréliée avec l'expression de CD38 et ZAP-70	Pelle, 2011
62	CD39		Expression sur les lymphocytes T (sang périphérique) associée à des stades avancés	Perry, 2012
68	CD39		Expression sur les lymphocytes T (sang périphérique) associée au stade, statut de traitement, TPT réduit, expression de ZAP-70 et statut mutational de IGHV	Abusamra, 2015
71	CD73		Mauvais pronostique (SG)	Kwon, 2020
424	CD73		Mauvais pronostique (SG)	Wang, 2019
LDGC-B				
Mélanome				
Mélanome malin				
52	MT5E	Régulation épigénétique (sous-segmenté lorsque méthylé)	La méthylation des îlots CpG du gène MT5E est associée avec un potentiel métastatique réduit	Wang, 2012
37	sCD73		Mauvais pronostique (SSP, SG)	Meredith, 2017
Mélanome				
32	CD73/CD39	*L'activité enzymatique est mesurée dans le sérum, avant traitement	Activité enzymatique associée avec un faible taux de réponse au Nivolumab (anti-PD-1)	
114	CD73		Expression combinée sur les Tregs (sang périphérique) associée avec le stade de la maladie	Di Gennaro, 2018
Pan-Cancers				
9,145	sign. ADO		Expression sur les TILs est associée à un bon pronostique (SG)	Monteiro, 2018
Variés				
Mauvais pronostique (SSP, SG)				

Abréviations: Nb =nombre de patients; Prot.=protéine; CCR=cancer colorectal; ER=récepteur à l'estrogène; HGS=haut grade séreux; CPNPC=cancer du poumon non à petites cellules; LAL=leucémie aiguë lymphoblastique; LLC=leucémie chronique; LDGC-B=lymphome diffus à granules B; SG=survie globale; SSR=survie sans récidive; TPT=temps jusqu'à la première thérapie; TILs=Lymphocytes T infiltrant; SSM=survie sans progression; SSSP=survie sans récidive; SSTRB=survie sans récidive biochimique; VPH=virus du papillome humain

Tableau 1.1 – Valeur pronostique des composantes de l'axe adénoïnergique dans les cancers humains.

1.2 *Streptococcus pneumoniae*

Le pneumocoque ou *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) est une bactérie de type Gram positif qui est responsable de diverses pathologies selon le site d'infection (356), principalement des pneumonies. La bactérie est découverte en 1881 par Louis Pasteur et est encore aujourd'hui responsable de bon nombre d'infections respiratoires (357, 358). Il a d'ailleurs été déterminé que le pneumocoque a été responsable de la majorité des décès survenus durant la pandémie d'influenza de 1918 (359). La présence de *S. pneumoniae* dans un tissu normalement stérile ou non-stérile caractérise les infections dites invasives (méningite, bactériémie) et non-invasives (infections respiratoires telles que les pneumonies, sinusites et otites) respectivement (357). Aux États-Unis d'Amérique, le taux annuel d'infections invasives et non-invasives est d'environ 13 et entre 32 et 500 cas par 100 000 personnes respectivement (357). Au Québec, les infections graves à pneumocoque sont responsables d'environ 3 000 à 6 000 hospitalisations et plusieurs décès annuellement. Les populations les plus susceptibles de développer des symptômes sévères et d'en décéder concernent principalement les personnes immunovulnérables, les personnes âgées de plus de 65 ans ainsi que les nouveau-nés de moins de 2 ans (357). À cause de l'acquisition fréquente de résistance aux antibiotiques, la vaccination demeure le moyen le plus efficace de prévenir les complications associées aux infections à pneumocoque.

1.2.1 Pathophysiologie

Les mécanismes de pathogénèse impliquent plusieurs composantes de *S. pneumoniae*. La composition de la capsule de polysaccharides, qui protège le pneumocoque contre la phagocytose, détermine la virulence de la bactérie, mais ne génère pas de réponse immunitaire de la part de l'hôte infecté (360). La paroi cellulaire composée de glycopeptides est responsable du recrutement de leucocytes dans les tissus infectés (360), de la réponse inflammatoire (361-363), de la réponse de coagulation (364) ainsi que des perturbations neuronales et vasculaires conséquentes aux infections (365-367). Finalement, des protéines de surfaces telles que la pneumolysine qui est impliquée dans la formation de pores membranaires composent également le pneumocoque (368). Ces protéines de surfaces contribuent à l'adhésion et la pénétrance des bactéries aux cellules du tract respiratoire, soit la voie d'entrée de la bactérie chez l'hôte (369-371).

1.2.1.1 Pneumonie

De façon mécanistique, une fois que la bactérie pénètre les voies respiratoires, les composantes de la paroi cellulaire se lient d'abord aux cellules alvéolaires de type II de façon à augmenter la perméabilité de la barrière épithéliale, notamment via la sécrétion abondante de pneumolysine, et à permettre l'accumulation de bactéries dans l'espace alvéolaire (372). Le contrôle de la multiplication bactérienne afin d'éviter la progression de l'infection vers la pneumonie est orchestré principalement via la reconnaissance des patterns moléculaires associés au pathogènes (PAMPs) par les cellules du système immunitaire inné, l'activation subséquente de la signalisation des TLRs, la production d'IL-6 et d'IL-1 β et finalement le recrutement et l'activation de neutrophiles et macrophages phagocytaires nécessaires à l'élimination du pneumocoque (373-377). Les pneumonies causées par *S. pneumoniae* s'accompagnent d'une accumulation de lymphocytes T $\gamma\delta$ et cellules NKT qui sont aussi importants à la résolution de l'infection (378-380).

1.2.1.2 Bactériémie

Alternativement, les infections mal contrôlées peuvent progresser depuis le site primaire d'infection en bactériémie via les molécules de phosphorylcholine (PC) présentes à la surface du pneumocoque qui engagent le récepteur de PAF et induisent le relargage de bactéries dans la circulation sanguine à l'aide de vacuoles qui transitent par les cellules endothéliales (373). De plus, le récepteur soluble à lipopolysaccharides CD14, présent dans l'espace alvéolaire, est essentiel à la dissémination du pneumocoque dans la circulation sanguine (381). Les composantes capsulaires du pneumocoque influencent principalement la multiplication bactérienne dans la circulation sanguine. En effet, la nature des polysaccharides qui composent la capsule détermine le niveau de protection du pneumocoque contre l'activation du complément ou contre son opsonisation et l'activation des phagocytes (382-385). La bactériémie augmente le risque de progression de l'infection vers le choc septique lorsque non traitée.

1.2.1.3 Méningite

Avec des titres élevés de bactéries dans la circulation sanguine, le pneumocoque devient susceptible d'entrer en contact et de pénétrer la barrière hématoencéphalique (BHE), encore une fois via le récepteur PAF et le trafic de vacuoles (386-388). L'absence de défenses immunitaires

de type inné dans le liquide cébrospinal accentue la multiplication bactérienne et le dommage neuronal une fois la BHE pénétrée (389). Alors que la méningite causée par *S. pneumoniae* est peu fréquente, celle-ci demeure plutôt létale (390).

1.2.1.4 Résistance aux antibiotiques

Initialement sensible à la pénicilline, plusieurs souches de *S. pneumoniae* résistantes à la pénicilline et autres antibiotiques sont rapidement apparues à travers le monde à la fin du 20^e siècle (391-393). En plus de la pénicilline, on retrouve désormais des souches de *S. pneumoniae* résistantes au cefotaxime, à l'érythromycine, au cotrimoxazol (triméthoprime et sulfaméthoxazole), à la tétracycline et au levofloxacin (**Tableau 1.2**) (394). Plus inquiétant encore, bien que l'augmentation du taux de résistance a semblé stagner au début des années 2000, en partie grâce à la vaccination, une large étude longitudinale conduite sur presque 40 000 échantillons de patients infectés au pneumocoque révèle que 30% des souches possèdent des résistances multiples allant jusqu'à 5 classes d'antibiotiques dans 8% des cas (395). En date du dernier recensement fait par le centre de contrôle et prévention de maladies des États-Unis (CDC) en 2018, aucune souche résistante à la vancomycine n'a été découverte encore (394). L'émergence de souches résistantes à la vancomycine et de résistances multiples demeure une importante préoccupation au contrôle de *S. pneumoniae* à l'échelle planétaire.

Antibiotique	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Pénicilline	95,0	1,4	2,0
Cefotaxime	96,4	1,4	0,2
Érythromycine	70,6	0,1	28,7
TMP/Sulfa	80,9	12,5	6,6
Tétracycline	88,0	0,0	12,0
Levofloxacin	99,9	0,0	0,1
Vancomycine	100,0	0,0	0,0

Tableau 1.2 – Taux de sensibilités aux antibiotiques des souches de *S. pneumoniae* recensé par le centre de contrôle et prévention des maladies des États-Unis (CDC) en 2018, sur 2 883 échantillons (394).

1.2.2 Immunisation contre *S. pneumoniae*

L'émergence de souches résistantes aux antibiotiques et le taux de mortalité accru dans les différentes populations à risque soulignent l'importance de la vaccination afin de prévenir les complications associées aux infections à pneumocoque (396). L'utilisation à grande échelle de

vaccins aide également à réduire l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques chez les jeunes enfants et personnes âgées (394). Deux types de vaccins ont été développés pour aider à prévenir les infections causées par le *S. pneumoniae*; les vaccins à polysaccharides et les vaccins à polysaccharides conjugués (358). Quatre vaccins ont été approuvés pour utilisation clinique par diverses agences de réglementation depuis 1983 (**Tableau 1.3**).

TABLE 2 Comparison of pneumococcal vaccine compositions

Vaccine (commercial name)	Yr licensed	Conjugation method	Carrier protein (content, µg)	Serotypes	Polysaccharide (content, µg)	Adjuvant
PPV23 (Pneumo 23)	1983	None	None	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F	25 per serotype	None
PCV7 (Prevnar)	2000	Reductive amination	CRM ₁₉₇ (20)	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	6B, 4; others, 2	Alum
PCV10 (Synflorix)	2008	Bifunctional spacer	NTHi protein D (9–16); tetanus toxoid (5–10); diphtheria toxoid (3–6)	PCV7 + 1, 5, 7F	4, 18C, 19F, 3; others, 1	Alum
PCV13 (Prevnar 13)	2009	Reductive amination	CRM ₁₉₇ (32)	PCV10 + 3, 6A, 19A	6B, 4.4; others, 2.2	Alum

Tableau 1.3 – Noms et compositions des vaccins approuvés pour la prévention des infections à *S. pneumoniae*.

© Reproduit de Geno et al. Clin Microbiol Rev, 2015. Avec la permission de ASM.

1.2.2.1 Vaccins à polysaccharides

Les premiers vaccins développés contre le *S. pneumoniae* sont de type vaccins à polysaccharides. Le seul vaccin à polysaccharides approuvé et utilisé aujourd'hui en clinique est commercialisé sous le nom de Pneumovax 23 (PPV23). Celui-ci contient des antigènes de polysaccharides des 23 sérotypes capsulaires les plus communément retrouvés dans les infections invasives en Occident et couvrent environ 9% des souches de *S. pneumoniae* (357, 393). Cependant, parce que le PPV23 induit une réponse humorale indépendante des lymphocytes T, son efficacité est moindre dans les populations immuno-compromises ainsi que chez les patients âgées ou les jeunes enfants, soit les populations les plus à risques d'infections sévères au pneumocoque (397, 398).

1.2.2.2 Vaccins à polysaccharides conjugués

Dans le but d'induire une meilleure réponse immunitaire, trois vaccins à polysaccharides conjugués, qui engagent une réponse immunitaire dépendante des lymphocytes T et qui sont plus immunogéniques (399), ont été approuvés et sont utilisés en clinique pour prévenir les infections à pneumocoques (**Tableau 1.3**). Le premier, commercialisé sous le nom de Prevnar 7 (PCV7) en 2000, qui contient 7 sérotypes d'antigènes de polysaccharides capsulaires conjugués à un variant

non toxique de la toxine diphtérique (CRM₁₉₇) s'est démontré particulièrement efficace à prévenir les infections à pneumocoque dans la population à risque de bas âge (393, 400). Malgré sa bonne efficacité vu sa couverture de 80% des sérotypes retrouvés chez les enfants en occident, son efficacité à long terme est compromise par l'émergence de souches de sérotypes différents, notamment le sérotype 19A associé à des résistances aux antibiotiques multiples (400-403). Afin d'élargir le spectre d'activité de PCV7, deux autres vaccins conjugués qui intègrent 10 et 13 sérotypes de *S. pneumoniae* sont ensuite développés, soit le Synflorix (PCV10) et Prevnar 13 (PCV13) respectivement (figure 2.1). Contrairement au vaccin PPV23, l'utilisation des vaccins conjugués est associée à un enrichissement de sérotype préalablement plus rare des bactéries colonisant le nasopharynx, altérant ainsi la prévalence des sérotypes de *S. pneumoniae* (404-407). Cette dérive sérotypique n'est pas toujours sans conséquences, tel qu'observé avec l'efficacité réduite du PCV7 administré dans une population d'enfants avec prévalence élevée de sérotypes résistants à la pénicilline, et demeure une préoccupation au développement de nouveaux vaccins (408, 409). De plus, alors que l'étendue de la protection du PPV23 couvrait initialement environ 15% plus de sérotypes responsables d'infections invasives que le PCV13 en Occident, depuis l'introduction de ce dernier l'écart de couverture s'est élargi jusqu'à 37% (410-412).

1.2.2.3 Programme de vaccination contre le pneumocoque

En Amérique du Nord, les programmes de vaccination prévoient entre 3 et 4 doses de vaccin conjugué (Synflorix et/ou Prevnar 13) pour les enfants de moins de 2 ans et au moins une dose de vaccin à polysaccharides (Pneumovax 23) chez les adultes de plus de 65 ans. Les personnes avec certaines conditions médicales qui les rendent plus à risque d'infections au pneumocoque peuvent également recevoir un vaccin à polysaccharides ou conjugué.

1.2.3 Mécanismes d'immunisations contre *S. pneumoniae*

Plusieurs types de lymphocytes B et T contribuent à l'immunisation naturelle et acquise contre le *S. pneumoniae*. Les lymphocytes B se répartissent en 2 classes de fonctions et phénotypes différents, soit les cellules conventionnelles (B-2) qui composent la majorité des lymphocytes B et les cellules de type inné (B-1) (**Figure 1.8**) (413, 414). Une fonction essentielle des cellules B-1 est la production spontanée d'anticorps naturels de types IgM et IgG3 spécifiques à certains

antigènes endogènes (Thy-1, PtC) et étrangers, dont certaines composantes de *S. pneumoniae* (PPS3 et PC) (413, 414).

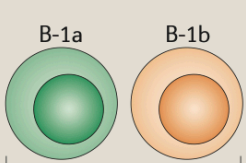
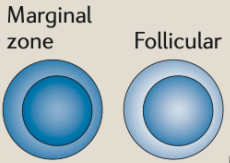
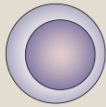
Cell surface phenotype	CD5 ⁺ CD19 ^{hi} CD1d ^{mid}	CD5 ⁻ CD19 ^{hi} CD1d ^{mid}	CD5 ⁻ CD19 ^{mid} CD1d ^{hi} CD21 ^{hi}	CD5 ⁻ CD19 ^{mid} CD1d ^{mid} CD23 ⁺ CD43 ⁻ IgM ^{low} IgD ^{hi}	CD5 ⁺ CD19 ^{hi} CD1d ^{hi} CD21 ^{hi/mid} CD23 ^{+/-} CD43 ⁻ IgM ^{hi} IgD ^{low/mid}
	CD23 ⁻ CD43 ⁺ IgM ^{hi} IgD ^{low}	CD23 ⁻ CD43 ⁺ IgM ^{hi} IgD ^{low}	CD23 ⁻ CD43 ⁻ IgM ^{hi} IgD ^{low}	CD23 ⁺ CD43 ⁻ IgM ^{low} IgD ^{hi}	
Frequency in total splenic B cell population	2%	<1%	15%	>70%	1%
	 <p>B-1a B-1b</p> <p>B-1 cells</p>		 <p>Marginal zone Follicular</p> <p>B-2 cells</p>		 <p>Regulatory B cell</p> <p>Relationship to B-1 and B-2 cells unclear</p>

Figure 1.8 – Caractérisation phénotypique et fréquence des lymphocytes B matures de rates de souris.

© Reproduit de Baumgarth N. Nat Immunol Rev, 2011. Avec la permission de Springer Nature.

1.2.3.1 Lymphocytes B-1

Selon le profil d'expression de l'antigène CD5, Les cellules B1 se subdivisent en 2 types de cellules, soit les cellules B-1a (CD5⁺) et B-1b (CD5⁻). Alors que l'immunité naturelle confère une protection rapide, mais de courte durée, l'immunisation acquise est requise pour une protection durable et robuste contre des titres élevées de bactéries *S. pneumoniae*. À cet effet, les cellules B-1a sont essentielles à la production d'anticorps naturels réactifs contre PPS3, un antigène majeur de la capsule de la souche WU2 de *S. pneumoniae* incluse dans le vaccin PPV23, alors que les cellules B-1b sont requises à la réponse humorale en réponse à l'immunisation spécifique au même antigène, chez la souris (415). La commutation isotypique, principalement via l'isotype IgG3, est essentielle à la protection contre le pneumocoque conféré par l'immunisation avec le PPV23 (416-419). Chez l'humain, alors que les mécanismes d'immunisation indépendants des cellules T par le PPV23 ne sont pas totalement définis (420), les cellules B-1 semblent jouer un rôle important tôt suivant la vaccination (421). Notamment, la diminution des pools de cellules B-1 avec l'âge est consistant avec une susceptibilité accrue aux infections à pneumocoque (422, 423).

1.2.3.2 Immunisation dépendante des lymphocytes T

Contrairement aux vaccins à polysaccharides qui stimulent la production d'anticorps directement depuis les cellules B, les vaccins conjugués requièrent l'intervention des lymphocytes T pour maximiser leur efficacité d'immunisation. En effet, suivant la vaccination, les complexes protéines-polysaccharides sont internalisés par les cellules dendritiques ou les cellules B et transportés aux nœuds lymphatiques où les réponses immunitaires sont engagées avec les lymphocytes T auxiliaire Th2 de sorte à favoriser la prolifération et la commutation isotypique des lymphocytes B via la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-6 (424, 425). Ce type de vaccin, étant plus immunogénique, est utilisé préférentiellement chez les jeunes enfants (409). Néanmoins, malgré son mécanisme d'immunisation indépendant des cellules T, l'utilité du PPV23 est mise en évidence par différentes études cliniques de larges cohortes qui démontrent l'impact bénéfique de la vaccination au PPV23 sur la réduction de la mortalité par pneumonie (426-428).

1.2.3.3 L'axe adénosinergique et la commutation isotypique

Peu d'études se sont intéressées au rôle de CD73 et de l'adénosine dans la pathogénèse des infections à pneumocoque. D'abord, une étude rapporte un rôle bénéfique de CD73 dans un modèle murin d'infection pulmonaire de *S. pneumoniae* en limitant les réactions inflammatoires exagérées et délétères via l'activité régulatrice de l'adénosine sur le recrutement de leucocytes polymorphonucléaires inflammatoires (429).

D'autres études suggèrent un rôle de CD73 dans la commutation isotypique des lymphocytes B, un processus important pour l'efficacité d'immunisation contre *S. pneumoniae*. D'abord, comparativement à CD39, l'expression de CD73 est peu commune sur les lymphocytes B. Dans les souris de souche C57Bl/6, environ 50% des cellules B-1 expriment CD73 alors que les lymphocytes conventionnels B-2 sont presque tous négatif pour l'enzyme (430). L'expression de CD73 est cependant régulée de façon développementale sur les lymphocytes B humains. En effet, les niveaux de CD73, mais pas de CD39, sont significativement plus faibles sur les cellules B naïves circulantes des nouveau-nés comparativement aux adultes (431) et sont associés avec la commutation isotypique des lymphocytes B naïfs et mémoires humains (432). *In vitro*, l'expression de CD73 est régulée positivement par l'IL-21, l'activation du BCR et la signalisation TLR et favorise la commutation isotypique des lymphocytes B conventionnels (B-2) (432). De

façon consistante, les lymphocytes B des patients atteints d'hypogammaglobulinémie commune, ou déficit immunitaire commun variable (CVID), qui démontrent une déficience dans le processus de commutation isotypique, présentent des niveaux diminués d'expression de CD73, mais pas de CD39 (432). Cependant, une étude récente rapporte un rôle négatif de la signalisation adénosinergique dans la commutation de classe des cellules B présentes dans les centres germinaux (433). En effet, le récepteur A2a sur les lymphocytes T CD4 limite l'accumulation de cellules T folliculaires dans les centres germinaux de sorte à altérer la prolifération et la commutation isotypique de type IgG1 des lymphocytes B (433).

1.2.4 Synthèse du chapitre

En résumé, bien que la vaccination ait grandement aidée à réduire l'impact populationnel néfaste des infections à *S. pneumoniae*, le pneumocoque demeure une source de préoccupation à l'échelle mondiale, notamment à cause de l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques et à l'efficacité d'immunisation limitée dans certaines populations à risque. L'identification de mécanismes modulables afin d'améliorer l'efficacité de vaccination dans ces populations demeure donc hautement pertinent.

1.3 La leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie la plus commune dans les pays occidentaux (**Figure 1.9**) et le nombre de nouveaux cas a plus que doublé depuis 1990 (434). La LLC est la leucémie la plus commune chez les adultes, l'incidence augmente avec l'âge et les hommes sont presque deux fois plus susceptibles d'en être atteint que les femmes (434, 435). De plus, de façon générale, les femmes présentent une LLC moins agressive, répondent mieux aux thérapies et possèdent de meilleures chances de survie que les hommes (435, 436). Bien que le taux de survie à 5 ans est de plus de 80% lorsque diagnostiquée précocement, l'évolution de la maladie est hautement variable d'un patient à l'autre, difficilement prévisible, largement incurable et offre un mauvais pronostic à des stades avancés (437, 438). Puisque les patients sont généralement âgés, la stratégie de prise en charge médicale s'initie par une surveillance sans interventions thérapeutiques jusqu'à ce que la leucémie devienne progressive ou symptomatique (437).

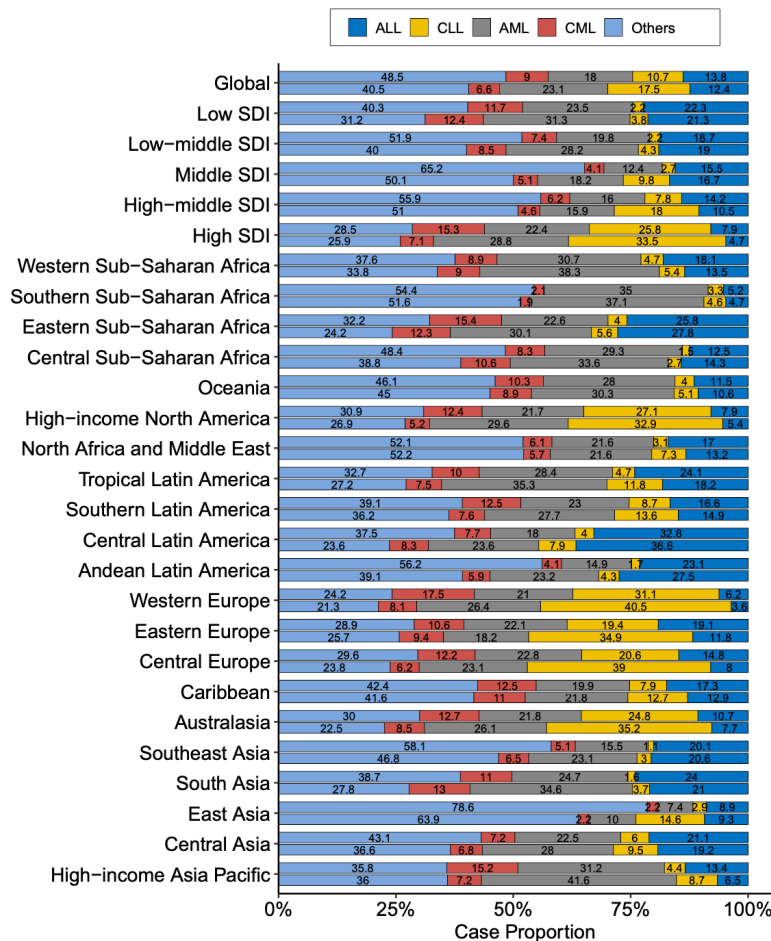


Figure 1.9 – Proportion des cas de leucémies selon le type et la localisation géographique en 1990 (bar du dessus) et 2017 (bar du dessous). ALL=Acute Lymphoblastic Leukemia; CLL=Chronic Lymphocytic Leukemia; AML=Acute Myeloid Leukemia; CML=Chronic Myeloid Leukemia; SDI=index sociodémographique.

© Dong et al. Exp Hematol Oncol, 2020. With permission from Springer Nature.

1.3.1 Pathophysiologie

La LLC est caractérisé par l'accumulation de lymphocytes B monoclonaux matures dans le sang, la rate, la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques (439). Aucun oncogène universel n'a été identifié comme étant responsable de l'initiation de la LLC, mais la nature monoclonale de la maladie suggère la présence de facteurs, notamment la stimulation antigénique, qui influencent la prolifération des clones précurseurs de la maladie. En effet, étant donné le nombre élevé de possibilités de recombinaison des gènes encodant pour les chaînes variables des immunoglobulines (Ig) des lymphocytes B, il est surprenant de constater une recombinaison presque entièrement identique des régions déterminant la complémentarité (CDR3) dans plusieurs patients atteints de la LLC (440). En effet, plusieurs études rapportent une grande similarité de réarrangement génétique des Ig entre plusieurs patients, ce qui suggère fortement qu'un ensemble d'antigènes, toujours inconnus, soit au moins en partie responsable de la sélection de clones leucémiques dans la LLC (441-443). D'ailleurs, l'activation soutenue du BCR protège les cellules leucémiques de l'apoptose induite par la fludarabine via la phosphorylation prolongée de ERK et Akt ainsi que la surexpression de la protéine de survie MCL-1 (444). De plus, plusieurs facteurs environnementaux tel que CD40L, BAFF, IL-6, IL-4 et TNF- α fournissent des signaux de survie aux cellules leucémiques et les protègent de l'apoptose (445). L'importance du microenvironnement dans la pathophysiologie de la LLC est mise en évidence par l'induction spontanée d'apoptose des cellules leucémiques lorsque cultivées *in vitro* en absence de cellules stromales nourricières (*nurse-like*) (446-448). Enfin, bien que la maladie présente une évolution variable d'un patient à l'autre, certaines composantes phénotypiques, sériques et génétiques peuvent servir de valeur pronostique et aider dans l'orientation des options thérapeutiques.

1.3.1.1 Diagnostic

La LLC se diagnostique via un bilan sanguin et une analyse phénotypique. La leucémie est confirmée selon ces deux critères : (#1) une lymphocytose caractérisée par la présence de plus de 5000 lymphocytes B monoclonaux par microlitre de sang et (#2) l'apparence majoritaire de petites cellules matures avec un large noyau dense (438). La clonalité doit être confirmée par cytométrie en flux de sorte à vérifier la restriction de l'expression des chaînes légères kappa et lambda des Ig (438). Une biopsie de nœuds lymphatiques et/ou de moelle osseuse peut être requise si l'analyse phénotypique du sang périphérique se montre non-concluante.

1.3.1.2 Présentation phénotypique

Bien que l'origine cellulaire de la LLC demeure incertaine chez l'humain (449), les cellules leucémiques présentent à leur surface une combinaison d'antigènes qui permet de les différencier d'autres populations lymphocytaires et d'autres types de leucémies. En plus d'exprimer les antigènes CD20, CD19 et CD23, contrairement aux lymphocytes B normaux, les lymphocytes B leucémiques expriment aussi l'antigène CD5, habituellement présenté par les lymphocytes T (450).

1.3.1.3 Composantes moléculaires, sériques et cytogénétiques

Plusieurs composantes moléculaires, sériques et cytogénétiques sont utilisées comme marqueurs pronostique de l'agressivité de la maladie (**Figure 1.10**), mais la présence de l'un ou plusieurs de ces facteurs ne correspond pas à un motif valable d'initiation de traitement (438, 450). Les marqueurs les plus souvent utilisés pour orienter la réponse aux thérapies sont les suivants : (#1) l'expression de CD38 sur les cellules leucémiques, (#2) le statut mutationnel de la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines de surface (IGHV), (#3) la délétion du chromosome 17p (del17p) ou le statut mutationnel de *TP53*. L'expression de ZAP-70 ou de CD49d, la complexité du caryotype ainsi que le statut mutationnel des gènes *NOTCH1*, *SF3B1* et *ATM* sont parfois utilisés en essais cliniques pour renseigner sur le pronostic des patients, mais sont rarement utilisés en pratique.

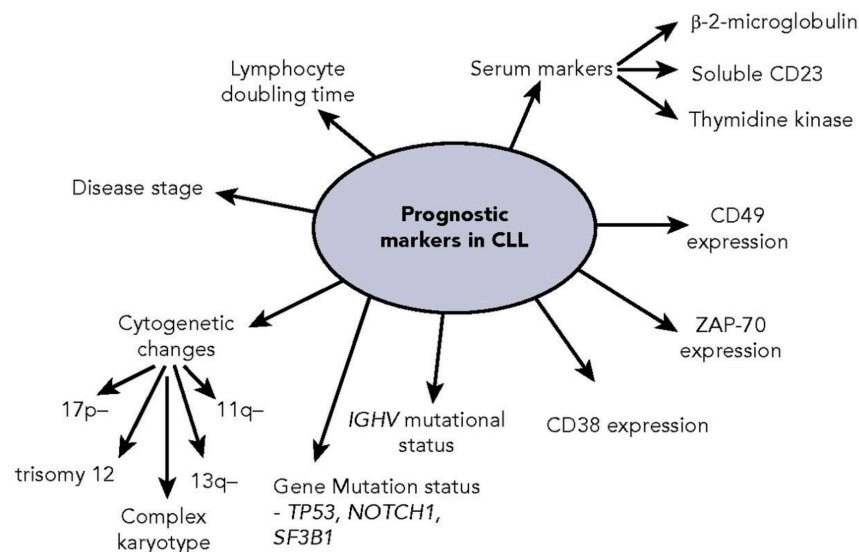


Figure 1.10 – Composantes à valeurs pronostiques dans la LLC.

© Reproduit de Gribben J. Blood, 2018. Avec la permission de Elsevier.

Une importante étude publiée en 1999 trouve une association négative dans la survie des patients atteints de la LLC et le niveau d'expression de l'antigène CD38 et le statut mutationnel d'IGHV (352). D'abord, l'expression de CD38 sur plus de 20-30% des cellules leucémiques est associée à une LLC plus agressive, qui répond moins bien à la chimiothérapie et à une survie globale grandement diminuée (352, 451-455). De façon mécanistique, CD38 est impliqué dans la recirculation, depuis la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes, des cellules leucémiques en interagissant avec l'axe CXCR4-SDF1 (*CXCL12*) (456). CD38 est aussi impliqué dans l'amplification de la signalisation du BCR, ce qui favorise la prolifération et la survie des cellules leucémiques (457-459). Le potentiel thérapeutique de cibler CD38 pour le traitement de la LLC n'est cependant démontré que très récemment avec un anticorps monoclonal, le daratumumab, et n'est donc pas encore utilisé en clinique (342). Ensuite, le statut mutationnel des gènes qui encodent pour les IGHV sépare les patients atteints de la LLC en deux catégories de risque distinctes. En effet, les patients dont la population clonale de cellules leucémiques présente au moins 98% d'homologie entre la région variable et homologue des cellules germinales sont caractérisés d'une LLC non-mutée (460) qui est associé à un mauvais pronostic (352, 461, 462).

Les altérations génomiques qui caractérisent les LLC qui répondent le moins aux thérapies et réfèrent aux pires pronostics concernent le gène suppresseur de tumeur *TP53*. La protéine p53 est impliquée dans une multitude de processus biologique dont la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et la réparation de l'ADN (463). Les mutations du gène *TP53* prédisposent donc à l'apparition de néoplasmes et sont retrouvées dans plus de 50% des cancers humains (464, 465). Chez les patients atteints de la LLC, la perte de fonction de p53 associée à un mauvais pronostic est décrite via deux mécanismes : (#1) via del(17p) sur lequel se trouve le locus de *TP53* ou (#2) via des mutations ponctuelles (466-470). La majorité des aberrations d'inactivation de *TP53* chez les patients atteints de la LLC conjugue une mutation sur l'un des allèles et une del(17p) sur l'autre (471). Puisque les aberrations de *TP53* sont souvent associées à l'évolution de la maladie et sont plus fréquentes chez les patients à des stades avancés ou réfractaires, la réévaluation du statut mutationnel de *TP53* est recommandée à plusieurs stades de la prise en charge thérapeutique (472-475). D'autres altérations génomiques un peu moins sérieuses concernant le pronostic, mais fréquemment décrites concernent la délétion du chromosome 11q ou 13q ainsi que la trisomie 12 (470, 474, 476, 477). Alternativement, des mutations dans les gènes codant pour *NOTCH1*, *SF3B1*

et *ATM* sont aussi fréquemment observées chez les patients qui présentent une LLC plus agressive (469, 474, 478-488). Enfin, la présence de plusieurs altérations génomiques conjuguées accentue négativement la valeur pronostique de ceux-ci (467, 474, 489, 490).

Finalement, la protéine kinase ZAP-70 est trouvée préférentiellement exprimée dans les cellules leucémiques avec un statut IGHV non-muté (462). ZAP-70 est impliquée dans la potentialisation du signal BCR dans les cellules leucémiques (491, 492). Étant donné l'importance de la signalisation BCR dans la survie des cellules leucémiques, l'expression de ZAP-70 dans les cellules leucémiques offre également un mauvais pronostic aux patients atteints de LLC (493-496). Par ailleurs, certaines études rapportent l'expression de l'intégrine alpha 4, ou CD49d, comme un puissant marqueur de mauvais pronostic indépendamment de l'expression de ZAP-70 et CD38 lorsqu'analysés par cytométrie en flux (497-499). Une étude récente suggère qu'en plus de servir de biomarqueur, CD49d est dynamiquement régulé et contribue à la progression de la leucémie (500). Finalement, la présence élevée de plusieurs marqueurs solubles indique également un mauvais pronostic tels que les niveaux sériques de β 2-microglobuline, de thymidine kinase et de CD23 (501-510).

1.3.1.4 Syndrome de Richter

Le syndrome de Richter caractérise la transformation de la LLC en lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) qui survient dans 2 à 15% des cas (438). Les patients chez qui arrivent cette transformation présentent généralement un mauvais pronostic, surtout s'ils ont préalablement reçu des traitements pour la LLC (438). La réponse thérapeutique aux traitements conventionnels pour traiter le DLBCL est généralement de courte durée et les patients sont donc encouragés à participer à des essais cliniques ou à tenter l'allogreffe de moelle osseuse (511).

1.3.2 Classification de la LLC

Suivant le diagnostic, il existe deux systèmes de classification de la LLC qui aident à stratifier le niveau de risque et guider la prise en charge thérapeutique, soit le système Rai et le système Binet (512), préférentiellement utilisés en Amérique du Nord et en Europe respectivement (tableau 3.1). Les deux systèmes sont facilement utilisables en clinique, reposent uniquement sur une évaluation physique et un décompte sanguin et guident l'initiation des traitements

thérapeutiques (513-515). Alors que des données sur la présence ou l'absence de bénéfice sur la survie des patients traités tôt avec des agents thérapeutiques novateurs manquent toujours, encore aujourd'hui, un suivi médical à chaque 3-12 mois sans intervention thérapeutique est indiqué pour les patients asymptomatiques qui présentent une leucémie précoce (438).

1.3.2.1 Système Rai et Binet

Le système Rai, initialement défini selon 5 niveaux en 1975 (516) et modifié en 1987 (517) pour faciliter son utilisation clinique, propose une classification en 3 groupes de risque selon le niveau de lymphocytose et la taille des organes lymphoïdes évaluée par palpation (**Tableau 1.4**). Le système Binet, défini en 1981, s'est proposé comme alternative simplifiée en classant les patients atteints de la LLC en 3 groupes plutôt que 5, comme initialement suggéré par Rai et al. (512). Similairement au système Rai, le système Binet repose sur la présence ou non d'anémie ou thrombocytopenie ainsi que sur l'hypertrophie des organes lymphoïdes, mais répertorie les patients selon la localisation anatomique de ces organomégalies. Les sites d'organomégalies sont définis ainsi : (#1) la tête et le cou, (#2) les régions axillaires, (#3) les régions inguinales, (#4) la rate et (#5) le foie (tableau 3.1) (450).

Table 1. Staging systems for CLL		
Stage		Definition
Binet system		
Binet A		Hb \geq 100 g/l (6.21 mmol/l), platelets \geq 100 \times 10 ⁹ /l <3 involved lymphoid sites ^a
Binet B		Hb \geq 100 g/l (6.21 mmol/l), platelets \geq 100 \times 10 ⁹ /l \geq 3 involved lymphoid sites ^a
Binet C		Hb <100 g/l (6.21 mmol/l), platelets <100 \times 10 ⁹ /l
Rai system		
Low-risk	Rai 0	Lymphocytosis $>$ 5 \times 10 ⁹ /l
Intermediate-risk	Rai I	Lymphocytosis and lymphadenopathy
	Rai II	Lymphocytosis and hepatomegaly and/or splenomegaly with/without lymphadenopathy
High-risk	Rai III	Lymphocytosis and Hb <110 g/l (6.83 mmol/l) with/without lymphadenopathy/organomegaly
	Rai IV	Lymphocytosis and platelets <100 \times 10 ⁹ /l with/without lymphadenopathy/organomegaly

Tableau 1.4 – Systèmes Rai et Binet utilisés pour la classification du niveau de risque des patients atteints de la LLC. Hb=hémoglobine. ^a Le système Binet classe 5 sites lymphoïdes potentiels, soit les aires cervicales, axillaires, inguinales (qu'elles soient unilatérales ou bilatérales), la rate et le foie.

© Reproduit de Eichhorst et al. Ann Oncol, 2021. Avec la permission de Elsevier.

1.3.3 Prise en charge thérapeutique

Sauf en cas d'absence d'évidences de LLC active ou symptomatique, les patients classés dans les stades intermédiaires ou avancés du système Rai ou dans les stades B ou C du système Binet nécessitent généralement une intervention thérapeutique (450). La leucémie est dite

« active » ou progressive et requiert l’initiation des traitements si au moins un de ces critères est rencontré : (#1) aggravation de l’anémie et/ou thrombocytopénie, (#2) splénomégalie progressive ou massive, (#3) adénopathie progressive ou massive, (#4) lymphocytose progressive, (#5) anémie auto-immune qui ne répond pas ou peu aux corticostéroïdes, (#6) présence de symptômes (perte de poids non-intentionnelle, fatigue, fièvre prolongée, sueurs nocturnes). Les facteurs de risques génétiques, l’âge, la condition physique, la durée et la disponibilité des différentes thérapies sont discutés avec le patient afin de choisir la meilleure option thérapeutique.

1.3.3.1 Évaluation de la réponse clinique

Les réponses aux thérapies des leucémies actives sont évaluées via l’analyse de la composition sanguine et de la moelle osseuse et sont caractérisées selon 6 stades : (#1) rémission complète, (#2) rémission partielle, (#3) progression, (#4) stable, (#5) rechute et (#6) réfractaire (450). Les critères qui définissent les différentes réponses cliniques sont décrits dans le tableau 3.2. De plus, pour être considéré en rémission complète, la LLC doit répondre à plusieurs critères (**Tableau 1.5**) au moins 2 mois suivant la fin de la thérapie. Alors qu’en pratique clinique une simple évaluation physique suffit, l’évaluation de l’hypertrophie des organes est préférablement vérifiée par analyses tomodensitométriques dans les essais cliniques. La maladie résiduelle minimale (MRD) mesurée par cytométrie en flux via une biopsie de moelle osseuse, définie par moins d’une cellule leucémique par 10 000 leucocytes, est également couramment utilisée dans les essais cliniques pour valider les rémissions complètes (450). Les patients dont la LLC n’est pas progressive, mais qui n’atteignent pas la rémission complète ou partielle présentent alors une maladie stable (450). Finalement, les patients dont la LLC est dite stable, réfractaire ou en rechute présentent tous un échec thérapeutique.

Réponse Clinique	Analyse sanguine	Examen physique
Rémission complète	<4000 lymphocytes <1500 neutrophiles <100 000 thrombocytes <110µg/µL d'hémoglobine	Pas de symptômes Pas d'hypertrophie du foie, rate et nœuds lymphatiques
Rémission partielle	Diminution de 50% des lymphocytes pendant plus de 2 mois Normalisation de 1+ décompte sanguin (neutrophiles, thrombocytes,	Diminution de 50% des organes hypertrophiés pendant plus de 2 mois
Progression	Augmentation de 50% des lymphocytes Transformation de Richter Cytopénie (neutrophiles, thrombocytes ou hémoglobine anormaux)	Apparition/élargissement d'hypertrophie
Stable	Ne répond pas aux critères de rémission ou de progression	
Réfractaire	Progression à l'intérieur de 6 mois après l'initiation du traitement	
Rechute	Progression après 6 mois suivant l'atteinte d'une rémission complète ou partielle	

Tableau 1.5 – Critères définissant les types de réponses cliniques possibles suivant le traitement de la LLC.

1.3.3.2 Chimiothérapie

Plusieurs agents chimiothérapeutiques sont approuvés pour le traitement de première et seconde ligne de la LLC. Le chlorambucil, un agent alkylant anticancéreux, s'est d'abord imposé comme thérapie standard de première ligne, mais son utilisation est désormais préférentiellement réservée à des fins palliatives chez les patients âgés dont la condition physique ne permet que ce traitement (437). En comparaison à la chlorambucil, la fludarabine, un analogue de purine, génère de meilleurs taux de réponse clinique lorsqu'utilisée en monothérapie (518). D'autres agents alkylants comme la bendamustine et le cyclophosphamide ont également démontré une certaine efficacité dans le traitement de la LLC (519-522). Lorsqu'utilisés en monothérapie, les agents chimiothérapeutiques traditionnels ne prolongent cependant pas la survie des patients atteints de la LLC et sont donc généralement utilisés en combinaison avec d'autres thérapies anti-cancéreuses.

1.3.3.3 Anticorps monoclonaux

Le développement d'anticorps monoclonaux qui ciblent l'antigène CD20 a grandement révolutionné l'approche thérapeutique des cancers hématologiques des lymphocytes B, notamment pour les patients atteints de LLC. Le rituximab, un anticorps chimérique approuvé en 1997 pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens, est le premier anticorps monoclonal anti-cancéreux approuvé par la FDA et fait toujours parti des anticorps monoclonaux les plus utilisés à ce jour (523). Le rituximab est approuvé pour le traitement de la LLC en 2010 lorsque son utilisation en première ligne en combinaison à la chimiothérapie standard démontre une amélioration de la survie globale, une première dans le traitement de cette leucémie à ce moment (524). De façon mécanistique, l'activité thérapeutique du rituximab repose d'une part sur l'induction de l'apoptose suivant son engagement avec l'antigène CD20 exprimé à la surface des cellules leucémiques (525). D'autre part, comme plusieurs anticorps monoclonaux, le rituximab aide à éliminer les cellules leucémiques via l'activation du complément (CDC) ainsi que par l'engagement de l'activité cytotoxique des cellules immunitaires NK et macrophages (ADCC) (526-531).

Certaines études ont cependant identifié plusieurs mécanismes de résistance aux rituximab, notamment via la perte d'activité du complément (532, 533). En effet, deux études indépendantes montrent que l'administration de plasma de sujet sains, afin de compléter les protéines du complément, chez des patients réfractaires aux thérapies sensibilisent la LLC au rituximab (534,

535). Ainsi, d'autres anticorps monoclonaux ciblant l'antigène CD20 avec de meilleures propriétés pharmacologiques ont été développés. Par exemple, l'ofatumumab et l'obinutuzumab sont tous deux des anticorps monoclonaux humanisés approuvés pour le traitement de la LLC qui démontrent une meilleure activité cytotoxique dépendante du complément en comparaison au rituximab (536, 537). Toutefois, il demeure possible que ces anticorps monoclonaux rencontrent d'autres limitations en clinique concernant l'expression de l'antigène CD20 à la surface des cellules leucémiques. En effet, l'exposition prolongée au rituximab induit une désensibilisation des cellules B leucémiques à l'activité pro-apoptotique de celui-ci, via la modulation des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (538, 539). De plus, la modulation négative de l'expression de l'antigène CD20 et l'internalisation rapide du rituximab par les lymphocytes B ont également été décrits comme facteurs important dans la limitation de l'activité thérapeutique du rituximab chez les patients atteints de la LLC (533, 540-543).

Alternativement, l'alemtuzumab, soit un anticorps monoclonal humanisé ciblant l'antigène CD52 exprimé à la surface de la plupart des cellules leucémiques (544), a été approuvé par la FDA en 2001 pour le traitement de la leucémie chronique myéloïde. Son efficacité thérapeutique est ensuite abondamment testée dans le traitement de la LLC et l'alemtuzumab se montre efficace chez les patients réfractaires à la chimiothérapie, de stades avancés ou du groupe de risque élevé muté pour *TP53* (545-548).

1.3.3.4 Inhibiteurs de tyrosine kinases

L'observation d'un pronostic moins favorable chez les patients dont la signalisation des Ig demeure intact (IGHV non-muté) témoigne de l'importance de la signalisation du BCR dans la survie et la prolifération des cellules leucémiques. Plus précisément, la signalisation du BCR est propagée via l'activation de plusieurs tyrosine kinases telles que BTK, SYK et PI3K- δ (549). Ainsi, le ciblage de molécules impliquées dans la signalisation du BCR, plus particulièrement BTK et PI3K, a révolutionné la prise en charge thérapeutique de la LLC. Notamment, l'idelalisib et le duvelisib sont tous deux des inhibiteurs des isoformes PI3K- δ et PI3K- γ respectivement et sont approuvés dans le traitement de la LLC (550-554).

Contrairement à l'isoforme PI3K- δ , la tyrosine kinase BTK n'est pas exprimée dans les lymphocytes T (549) et est surexprimée dans les cellules leucémiques comparativement aux lymphocytes B normaux (445). L'ibrutinib est un inhibiteur sélectif de BTK qui bloque l'activation de la signalisation de survie dépendante des MAPK, de PI3K et de NF- κ B (445). Plusieurs essais cliniques démontrent son efficacité supérieure à plusieurs autres thérapies dont le chlorambucil et l'ofatumumab (555, 556). L'efficacité thérapeutique de l'ibrutinib est cependant compromise suivant l'acquisition de mutations de BTK chez certains patients réfractaires qui leur confère alors un mauvais pronostic suivant l'arrêt de la thérapie (557-559). Pour surmonter cette résistance, des stratégies qui visent la dégradation de l'enzyme BTK sont en développement, dont un inhibiteur de la protéine chaperonne Hsp90 (560). Alternativement, l'acalabrutinib, un inhibiteur irréversible de BTK qui présente une plus grande sélectivité que l'ibrutinib, a récemment été approuvé pour le traitement de patients avec une LLC en rechute (561-563).

Comparativement au rituximab et à la chimiothérapie, une vaste étude américaine démontre que l'ibrutinib utilisé seul augmente d'environ 10 fois les risques de fibrillations auriculaires et d'entre 2 à 6 fois les risques de saignements hémorragiques (564). Une autre étude récente rapporte une prise de poids importante chez les patients atteints de la LLC traité avec l'ibrutinib (565). Alors qu'il demeure incertain si la prise de poids est un effet indésirable de la thérapie ou est tributaire de la réponse thérapeutique et la résolution de la cachexie induite par la LLC, une observation similaire est rapportée chez les patients atteints de la LLC traités avec l'acalabrutinib (561). Étant donné que presque la moitié des patients atteints de la LLC présentent au moins une comorbidité cardiovasculaire au moment du diagnostic et qu'un décès sur quatre est associé à des comorbidités, la prise de poids attribué à ces thérapies n'est donc pas forcément sans conséquence (566).

1.3.3.5 Inhibiteurs de protéines anti-apoptotiques

La protéine Bcl-2 fait partie d'une famille de protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose cellulaire et favorise la survie des cellules cancéreuses via son rôle anti-apoptotique (567). En effet, son activité est associée à la résistance au rituximab dans certaines lignées cancéreuses de lymphocytes B (539). Ainsi, le venetoclax, un inhibiteur de Bcl-2, a démontré une efficacité thérapeutique entre autres chez les patients réfractaires à la chimiothérapie et les patients

à mauvais pronostic (IGHV non-muté ou del(17p)) (568-570). Néanmoins, l'étude de patients réfractaires révèle plusieurs altérations métaboliques et génomiques dont la surexpression des protéines de survie Bcl-XL et MCL-1 ainsi que diverses mutations du gène encodant pour Bcl-2 qui confère une résistance au venetoclax (571-575).

1.3.3.6 Allogreffe de moelle osseuse

L'allogreffe de moelle osseuse réfère à la transplantation de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur d'HLA compatible afin de remplacer les cellules leucémiques d'un patient atteint de la LLC. L'allogreffe représente l'unique option thérapeutique potentiellement curative de la LLC, mais les complications associées aux traitements de conditionnement à fortes doses pré-transplantation et les risques de rejets post-transplantation limitent l'applicabilité de cette pratique thérapeutique (576). L'allogreffe est envisageable, en traitement de seconde ligne, pour les patients moins âgés qui ne présentent pas de comorbidités, dont la réponse aux traitements de première ligne est de courte durée et qui appartiennent à des groupes de risques élevés ou dont la LLC s'est transformée en DLBCL (Syndrome de Richter), selon la disponibilité de donneurs compatibles (576).

1.3.3.7 Combinaisons thérapeutiques de première et seconde ligne

La réponse thérapeutique est généralement plus importante dans le traitement de la LLC lorsque plusieurs agents anticancéreux sont combinés (524). Par contre, puisque le régime FCR (fludarabine, cyclophosphamide et rituximab) est mal tolérée chez les patients âgés de plus de 65 ans et génère une réponse moins durable chez les patients qui présentent des Ig non-mutées, il est possible de substituer la fludarabine et le cyclophosphamide par la bendamustine (BR; bendamustine et rituximab) ou de combiner l'ibrutinib à l'obinutuzumab comme option plus tolérable pour ces patients (577, 578). Pour les patients âgés dont la condition physique le permet ou les patients à risques élevés au statut IGHV non-muté, puisque l'ajout du rituximab aux inhibiteurs de tyrosines kinases n'apporte pas d'avantage thérapeutique additionnel, l'ibrutinib en monothérapie demeure le traitement de choix (579-581). Pour leur part, les patients qui présentent une del(17p) ou une mutation de *TP53* sont généralement réfractaires au régime FCR de base et s'offre alors à eux l'ibrutinib, le venetoclax en combinaison à l'obinutuzumab ou l'idelalisib en

combinaison au rituximab (437). Un algorithme décisionnel tel que présenté au **tableau 1.6** résume les alternatives disponibles de traitement en première intention.

Stage	del(17p) or p53mut	Fitness	IGVH	Therapy
Binet A-B, Rai 0-II, inactive disease	Irrelevant	Irrelevant	Irrelevant	None
Active disease or Binet C or Rai III-IV	Yes	Irrelevant	Irrelevant	Ibrutinib or Venetoclax + Obinutuzumab or Idelalisib + Rituximab (if contraindications for ibrutinib)*
	No	Go go	M	FCR (BR above 65 years) or ibrutinib*
			U	Ibrutinib or FCR (BR above 65 years)*
	No	Slow go	M	Venetoclax + Obinutuzumab or Chlorambucil + Obinutuzumab or Ibrutinib*
U			Venetoclax + Obinutuzumab or Ibrutinib or Chlorambucil + Obinutuzumab*	

Tableau 1.6 – Algorithme décisionnel du choix des traitements de première ligne pour les patients atteints de la LLC. M=muté, U=non-muté (*unmutated*). FCR=fludarabine, cyclophosphamide et rituximab. *Temps de traitement fixe ou continu à discuter avec le patient.

© Reproduit et modifié à partir de Hallek M. Am J Hematol, 2019. Avec la permission de John Wiley and Sons.

Enfin, le choix de thérapie de seconde ligne dépend en partie de l'étendue de la réponse observée en première ligne. Si la durée de rémission est de plus de 3 ans, la même combinaison thérapeutique utilisée en première ligne peut alors être réemployée (437, 438, 450). Par contre, pour les patients réfractaires aux thérapies de première ligne dont la réponse est de courte durée (moins de 3 ans), il est nécessaire de changer d'options thérapeutiques, encore une fois en fonction de la condition physique des patients et du groupe de risque associé à la LLC.

1.3.4 Composantes immunologiques et immunothérapies

Plusieurs altérations immunologiques sont rapportées chez les patients atteints de la LLC qui favorise la croissance tumorale via une diminution du contrôle immunologique anti-tumoral. D'abord, des études rapportent une augmentation de la fréquence de cellules Tregs chez les patients atteints de la LLC en comparaison à des sujets sains et une corrélation entre l'accumulation des Tregs et l'avancement de la maladie, ce qui suggèrent qu'une augmentation de la tolérance immunologique favorise la progression de la LLC (582-587). Ensuite, l'expression élevée des points de contrôle immunologique PD-1, TIGIT et CTLA-4 à la surface des lymphocytes T circulants des patients atteints de la LLC suggère l'acquisition d'un phénotype d'épuisement suivant la progression de la maladie (588-590). De plus, les lymphocytes T des patients atteints de la LLC ont été rapportés comme étant dysfonctionnels dans la formation de synapses immunologiques avec les cellules leucémiques (591). En effet, des études rapportent que

l'inefficacité du contrôle anti-tumoral par les lymphocytes T peut être renversé de façon thérapeutique et met donc en évidence le potentiel clinique de l'immunothérapie pour le traitement de la LLC.

1.3.4.1 Inhibiteurs de points de contrôle immunologique

Plusieurs études rapportent le rôle de l'axe PD-1/PD-L1 dans la diminution des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 chez les patients atteints de la LLC (592). D'une part, l'expression de PD-L1 est trouvée augmentée sur les cellules leucémiques des patients atteints de la LLC en comparaison aux lymphocytes B de sujets sains (593). Également, l'interaction des cellules leucémiques avec leur microenvironnement est susceptible de réguler positivement l'expression de PD-L1 à leur surface (594). D'autre part, comparativement à des sujets sains, les patients atteints de LLC possèdent plus de lymphocytes T CD4 et CD8 qui expriment PD-1 (592). Par ailleurs, l'activation de la signalisation PD-1 dans les monocytes de patients atteints de la LLC altère leur activité métabolique glycolytique et leurs fonctions phagocytiques (595). Chez la souris, l'inhibition de PD-L1, le ligand du récepteur PD-1, dans un modèle de transfert adoptif de cellules leucémique murines (E μ -TCL1) rétabli les fonctions effectrices, cytolytiques et de formation de synapses immunologiques des lymphocytes T CD8 en plus de retarder le développement de la LLC (596, 597). Finalement, deux études cliniques de phase 1 et 2 montrent une certaine efficacité du pembrolizumab et du nivolumab, deux anticorps monoclonaux ciblant PD-1, dans le traitement de la LLC (598, 599). Le taux de réponse demeure modeste et aucun inhibiteur de points de contrôle immunologique n'est encore approuvé pour le traitement de la LLC.

1.3.4.2 Cellules T à récepteur antigénique chimériques (CAR T)

Le transfert adoptif de CAR T dirigé contre l'antigène CD19 a révolutionné le traitement de certains néoplasmes hématologiques de cellules B (600). Alors qu'aucun CAR n'est encore approuvé pour le traitement de la LLC, certaines études décrivent leur potentiel thérapeutique. Notamment, une étude de cas révèle que l'utilisation d'un CAR dirigé contre CD19, qui exprime également le récepteur de costimulation 4-1BB (CD137), résulte en une rémission complète de plus de 10 mois chez un patient avec une LLC réfractaire (601). Plus récemment, après le transfert de CAR dirigé contre CD19 chez des patients réfractaires à l'ibrutinib ou au venetoclax, sur 24 patients, 17 ont observé une rémission complète ou partielle (602).

1.3.5 L'axe adénoenergique

Alors que l'importance de l'axe adénoenergique dans la progression cancéreuse est surtout connue dans les tumeurs solides, quelques études décrivent l'hyperactivité de l'axe adénoenergique dans la LLC (**Figure 1.11**).

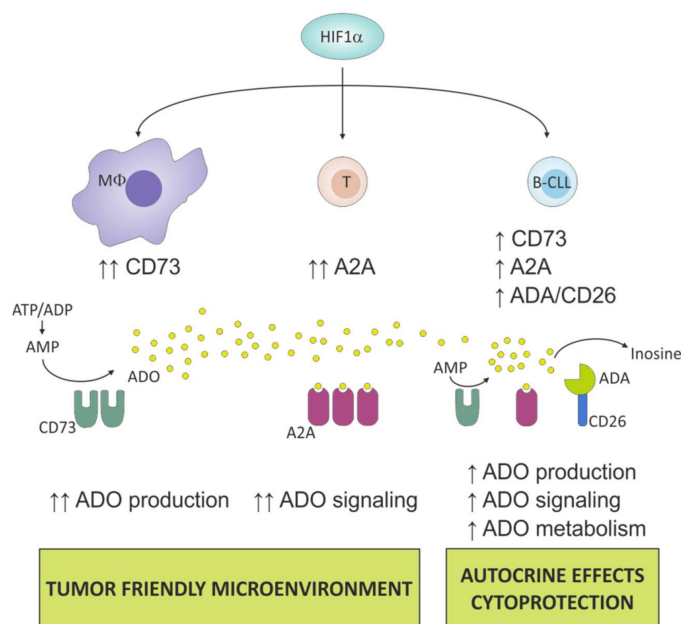


Figure 1.11 – L'axe adénoenergique est régulé positivement dans la LLC. Les niches lymphoïdes de la LLC sont des environnements hypoxiques étant donné les niveaux élevés de HIF-1α qui est connu pour moduler positivement l'expression de plusieurs acteurs de l'axe adénoenergique sur divers types de cellules qui composent les niches. ADO=adénosine; MØ=macrophage; T=lymphocyte T; B-CLL=cellule leucémique de LLC.

© Reproduit et modifié à partir de Vaisitti et al. Int J Mol Sci, 2018. Avec la permission de MDPI.

1.3.5.1 CD73

D'abord, lorsque vérifiée par immunohistochimie, l'expression de CD73 est trouvée restreinte aux foyers prolifératifs de la LLC et plus particulièrement sur les cellules leucémiques qui expriment de hauts niveaux du marqueur de prolifération Ki-67 (603). En effet, lorsqu'analysé par cytométrie en flux, environ un patient sur trois présente des cellules leucémiques circulantes dans le sang périphérique qui expriment CD73 (603). De façon surprenante, l'expression de CD73 sur les cellules leucémiques est trouvée diminuée comparativement aux lymphocytes B normaux (604, 605). Toutefois, alors que le niveau d'intensité d'expression de CD73 varie grandement d'un patient à l'autre, son expression est associée à des plus hauts niveaux d'expression de CD38 et

ZAP-70 sur les cellules leucémiques (603). Consistant avec la caractérisation d'une LLC plus agressive, une étude récente montre que l'expression de CD73 sur les cellules leucémiques corrèle positivement avec les niveaux de β 2-microglobuline circulante (604). Finalement, cette même étude rapporte une meilleure survie globale pour les patients dont les cellules leucémiques expriment de faibles niveaux de CD73 avec un temps médian de survie prolongé de presque du double de celui des patients qui en expriment des hauts niveaux (604).

1.3.5.2 CD39

Contrairement à CD73, l'enzyme CD39 est fortement exprimée sur les cellules leucémiques circulantes dans le sang périphérique chez tous les patients atteints de la LLC (603). En comparaison aux sujets sains, l'expression de CD39 est augmentée sur les lymphocytes T CD4 et CD8 circulants ainsi que les Tregs et corrèle positivement avec le stade de la maladie (585, 605, 606). Similairement à CD73, l'expression de Ki-67 est associée avec une augmentation de l'expression de CD39 (607). Cependant, des hauts niveaux d'expression de CD39 sur les cellules leucémiques des patients atteints de la LLC sont généralement associés à un meilleur pronostic (608). En effet, les patients qui possèdent une LLC avec un niveau d'expression de CD39 élevé présentent généralement une LLC de stade précoce et une survie sans traitement plus longue (606). De façon consistante, l'expression de CD39 sur les cellules leucémiques est enrichie chez les patients à faibles risques dont la LLC est caractérisée par un statut IGHV muté (609). Finalement, alors que les cellules leucémiques sont capables de dégrader l'ATP en ADP et en AMP de façon autonome vu l'expression ubiquitaire de CD39 à la surface des cellules, la présence d'au moins 30% de cellules leucémiques qui expriment CD73 est requise pour la production significative d'adénosine (603). CD73 est donc l'enzyme limitante dans la conversion de l'ATP en adénosine par les cellules leucémiques de la LLC.

1.3.5.3 Adénosine désaminase et transporteurs de nucléosides

L'enzyme ADA qui est responsable de la désamination de l'adénosine en inosine peut être retrouvée de façon soluble ou membranaire via la protéine d'ancrage CD26. Alors que l'expression de CD26 membranaire est variable entre patients atteints de la LLC, son expression est associée à une plus courte survie sans traitement et corrèle avec les marqueurs de mauvais pronostic tels que CD38, CD49d, ZAP-70, la β 2-microglobuline soluble et le statut IGHV non-muté (610-612). De

plus, les niveaux sériques élevés de CD26 solubles sont aussi associés à une survie sans traitement plus courte (613). De façon consistante, l'activité enzymatique d'ADA est supérieure chez les patients atteints de la LLC lorsque comparée à celle mesurée dans le sérum de sujets sains et corrèle avec certains marqueurs d'agressivité dont la β 2-microglobuline (614).

L'importance des transporteurs de nucléosides exprimés par les cellules leucémiques dans la LLC concerne principalement leur rôle dans la biodisponibilité des agents anti-cancéreux de type analogue de nucléoside comme la fludarabine. En effet, le transport intracellulaire de la fludarabine dépend principalement des transporteurs ENTs dont les niveaux d'expression sont associés à la cytotoxicité de la fludarabine *ex vivo* (615, 616).

1.3.5.4 Récepteur A2a

Le récepteur A2a est le principal récepteur à l'adénosine exprimé par les cellules leucémiques humaines, alors que les récepteurs A2b, A1 et A3 ne sont pratiquement pas exprimés au niveau génique (603). Comparativement aux lymphocytes B normaux de sujets sains, son expression est également trouvée augmentée sur les cellules leucémiques (603). Son rôle dans la pathophysiologie de la LLC a donc été étudié.

D'abord, la signalisation A2a inhibe la chimiotaxie en réponse à la chimiokine SDF-1 (*CXCL12*) via la régulation négative du récepteur CXCR4 et suggère alors que l'adénosine contribue à la rétention des cellules leucémiques dans les niches lymphoïdes qui supportent leur prolifération (603). Ensuite, la signalisation A2a prévient l'apoptose des cellules leucémiques induite par la chimiothérapie en modulant positivement et négativement l'expression des protéines MCL-1 et BAX respectivement et en diminuant l'activation de la protéine pro-apoptotique caspase-3 (603). Finalement, dans un modèle de transfert adoptif de cellules leucémiques de LLC de souris, l'inhibition de la signalisation adénosinergique médiée par le récepteur A2a rétablit les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 et prévient l'expansion des Tregs, sans toutefois pour autant retarder la progression tumorale (617). De façon intéressante, l'inhibition d'A2a augmente l'efficacité anti-tumorale du rituximab dans un modèle de lymphome murin en augmentant la phagocytose médiée par les macrophages (175). Il n'existe aucune information quant au rôle potentiel des autres récepteurs à l'adénosine dans la pathophysiologie de la LLC.

1.3.5.5 Hypoxie et adénosine

Les cellules leucémiques de la LLC nécessitent la présence de cellules nourricières telles que les macrophages (MØ), les cellules mésenchymateuses stromales (MSC) ainsi que les cellules dendritiques folliculaires (FDC) dans les niches lymphoïdes pour proliférer (**Figure 1.12**). La faible teneur en oxygène qui caractérise ces niches de prolifération contribue à la pathophysiologie via la régulation du facteur de transcription HIF-1 α (618). De par la régulation positive des acteurs de l'axe adénosinergique via HIF-1 α , l'hypoxie renforce la signalisation adénosinergique dans les niches lymphoïdes et contribue à la génération d'un microenvironnement immunosuppresseur (**Figure 1.12**) (619). En effet, l'expression de CD39, CD73, A2a, CD26 et ENTs est augmentée dans les échantillons de nœuds lymphatiques en comparaison au sang périphérique des patients atteints de la LLC (619). De plus, lorsque cultivées *in vitro* en condition hypoxique, les cellules nourricières tel que les macrophages augmentent leur production d'adénosine via l'expression de CD73 et la signalisation médiée par le récepteur A2a contribue à leur polarisation en type M2 (619). Aussi, la culture *in vitro* en condition hypoxique de lymphocytes T dérivés de patients atteints de la LLC favorise l'accumulation de Tregs, la diminution des niveaux d'ARN messager d'IFN- γ ainsi que l'augmentation d'IL-10 et du récepteur PD-1 de manière dépendante de la signalisation A2a (619). Finalement, la signalisation adénosinergique médiée via le récepteur A2a contribue partiellement à la reprogrammation métabolique glycolytique des cellules leucémiques et des lymphocytes T dans les niches hypoxiques (619).

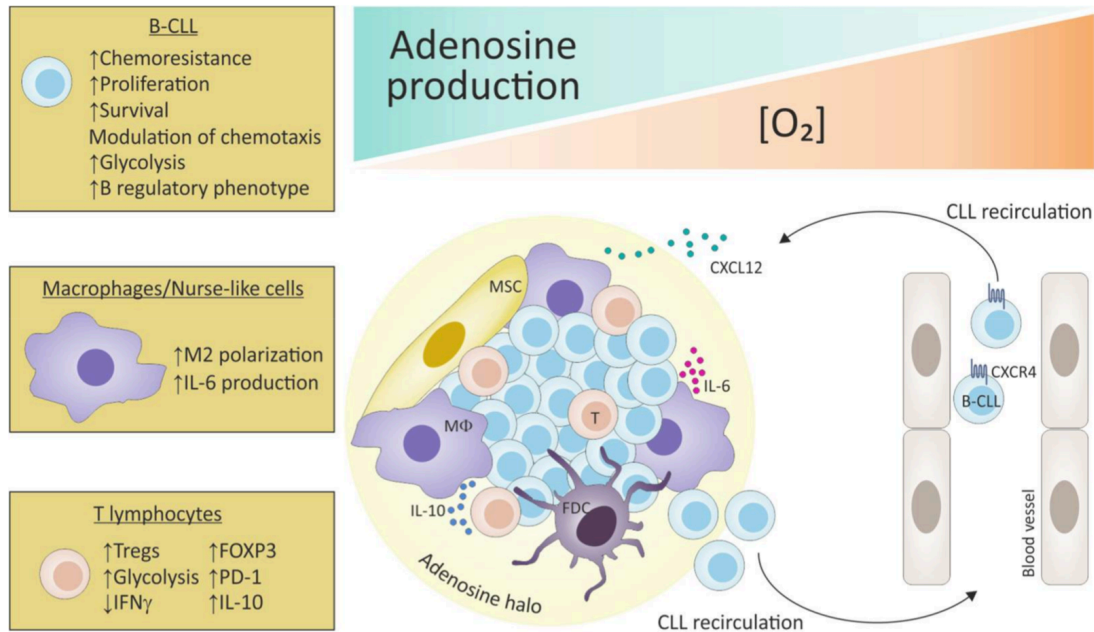


Figure 1.12 – Rôle immunosuppresseur de l'adénosine dans la niche lymphoïde dans la LLC. Les cellules leucémiques peuvent circuler depuis la circulation périphérique jusqu'aux organes lymphoïdes en suivant un gradient de chimiokine dont SDF-1 (*CXCL12*). Dans la niche tumorale, les cellules leucémiques de la LLC entrent en contact avec des macrophages (M Φ)/cellules nourricières (*nurse-like*), des cellules mésenchymateuses (MSC), des cellules dendritiques folliculaires (FDC) et les lymphocytes T (T). Ces niches caractérisées par une faible teneur en oxygène (O₂) sont riches en adénosine de sorte à favoriser la progression de la LLC, tel que décrit dans les encadrés jaunes.

© Reproduit de Vaisitti et al. Int J Mol Sci, 2018. Avec la permission de MDPI.

1.3.6 Modèles murins de LLC

En s'inspirant d'altérations génétiques observées chez les patients humains, plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées qui modélisent des leucémies qui s'apparentent à la LLC humaine ont été développés. L'utilité des divers modèles varie selon le niveau de pénétrance dans la génération d'une LLC murine (**Tableau 1.7**). La souris transgénique E μ -TCL1 qui présente une pénétrance absolue d'une leucémie similaire à la LLC agressive humaine est le modèle préclinique le plus fréquemment utilisé pour étudier les processus pathogéniques et l'efficacité thérapeutique de nouveaux agents anticancéreux (620-623).

Mouse model	Disease penetrance	Time of appearance of circulating leukemic cells	Age of death	IG gene rearrangements
<i>mir-15a/16-1</i> ^{-/-} and <i>mir-15a/16-1</i> ^{flxed} CD19-Cre	~20% CLL ~8% MBL ~2% CD5 ⁺ NHL	12-18 mo	15-18 mo	Unmutated and stereotypic IGHV genes
<i>14qC3-MDR</i> ^{-/-} and <i>MDR</i> ^{flxed} CD19-Cre	~22% CLL ~12% MBL ~6% CD5 ⁺ NHL	6-18 mo	12-18 mo	Unmutated and stereotypic IGHV genes
<i>14qC3-CDR</i> ^{flxed} CD19-Cre	~50% CLL ~3% MBL	6-18 mo	12-18 mo	Unmutated and stereotypic IGHV genes
<i>Eμ-TCL1</i> tg	100% CLL	6 mo	12-18 mo	Unmutated IGHV genes, stereotypic IGHV and IGLV genes
<i>APRIL</i> tg	40% CLL	Not analyzed	12 to >15 mo	Not analyzed
<i>BCL2</i> × <i>traf2dn</i> tg	80% CLL	9-15 mo	>80% dead at 14 mo	Clonal IGHV rearrangements
<i>ROR1</i> tg	5% CLL	>15 mo	>15 mo	Clonal IGHV rearrangements
<i>Eμ-mir-29</i> tg	20% CLL	12-24 mo	24-26 mo	Clonal IGHV rearrangements
<i>Vh11</i> × <i>irf4</i> ^{-/-}	100% CLL (preceded by MBL in >40% cases)	5-10 mo	>9 mo	Clonal IGHV rearrangements (determined by FACS)
<i>IgH.TEμ</i>	100% CLL	<5 mo	Killed at 2-10 mo	Unmutated IGHV genes (preferentially <i>Vh11</i>) and some highly mutated

Tableau 1.7 – Caractéristiques des modèles de souris transgéniques qui modélisent une LLC murine. mo=months; tg=transgénique; FACS=fluorescence-activated cell sorting.

© Reproduit de Simonetti et al. Blood, 2014. Avec la permission de Elsevier.

1.3.7 Synthèse du chapitre

En résumé, la LLC, soit la leucémie la plus fréquente chez l'adulte et la plus commune en occident, est difficilement traitable malgré le large éventail d'option thérapeutique et présente un mauvais pronostic en cas d'échec thérapeutique. La LLC s'accompagne d'importantes altérations dans le compartiment immunitaire des patients et quelques études décrivent l'activité de l'axe adénosinergique dans les patients atteints de la LLC ainsi que dans des modèles précliniques. Étant donné son potentiel déjà décrit dans plusieurs contextes de tumeurs solides, il est possible que l'axe adénosinergique représente une cible intéressante pour le traitement de la LLC.

1.4 Le métabolisme des cellules cancéreuses

En situation d'abondance d'oxygène, les cellules de mammifères convertissent le glucose en pyruvate qui est ensuite oxydé en dioxyde de carbone par les mitochondries. Lorsque l'oxygène se fait rare, très peu de pyruvate est utilisé pour alimenter le métabolisme mitochondrial et celui-ci est plutôt relâché dans le milieu extracellulaire sous forme de lactate par les cellules. Il y a presque 100 ans, Otto Warburg observe que les cellules cancéreuses cultivées *in vitro* consomment et sécrètent des quantités importantes de glucose et lactate, même en présence suffisante d'oxygène pour métaboliser complètement le glucose en CO₂, ce qu'il décrit comme métabolisme glycolytique aérobie et qui est désormais souvent référencé comme l'effet Warburg (**Figure 1.13**) (624, 625). La reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses constitue une caractéristique phare de la progression tumorale (626).

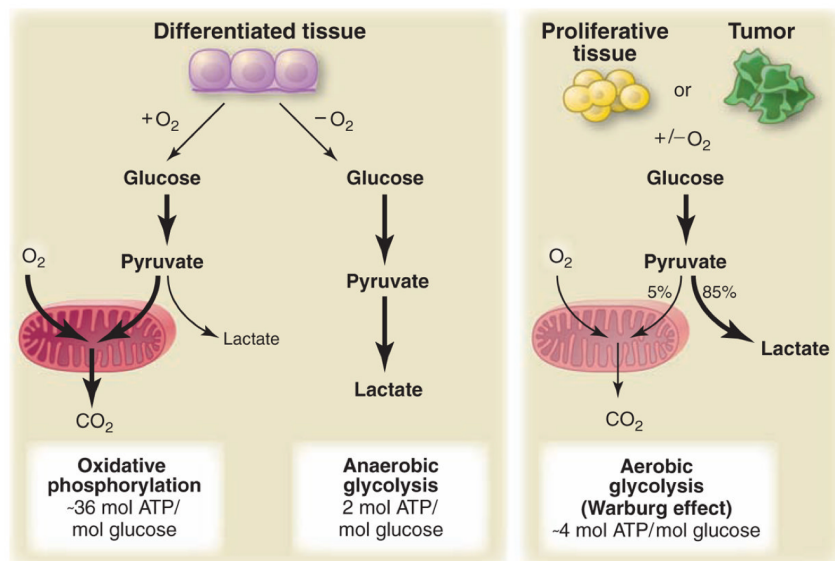


Figure 1.13 – Représentation schématique des différences énergétiques entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et aérobie (effet Warburg) dans les cellules non-cancéreuses et cancéreuses. O₂=oxygène; CO₂=dioxyde de carbone.

© Reproduit de Vander Heiden et al. Science, 2009. Avec la permission de AAAS.

Étonnement, contredisant certaines de ses observations, Warburg argumente une défectuosité de la respiration mitochondriale dans les cellules cancéreuses pour expliquer le métabolisme glycolytique aérobie (625, 627). La variabilité de l'étendue de l'effet Warburg entre les diverses lignées cellulaires soulève cependant plusieurs questions concernant le métabolisme des cellules cancéreuses. Par exemple, une analyse de plus de 80 lignées cellulaires

du cancer du poumon révèle une importante hétérogénéité dans la relation entre la consommation de glucose et la production de lactate (628).

Ironiquement, alors que son nom est souvent associé au métabolisme glycolytique, les travaux de Warburg sont également pionniers dans notre compréhension moderne de la respiration mitochondriale. En effet, l'une des découvertes les plus importantes de Warburg, récompensée d'un prix Nobel de médecine en 1931, a rapport aux mécanismes de transfert d'oxygène durant la fermentation via l'enzyme cytochrome a_3 , aujourd'hui connue comme étant la cytochrome oxydase retrouvée dans le complexe IV de la chaîne de transport d'électron mitochondriale (ETC) (629). Avec l'effervescence grandissante de la recherche sur le métabolisme cancéreux des dernières décennies, il est désormais compris que l'effet Warburg ne prédit généralement pas de perte du métabolisme oxydatif dans les cellules cancéreuses et que la respiration mitochondriale revêt une importance capitale dans beaucoup de cancers, expliquant le développement clinique de plusieurs agents thérapeutiques anti-cancéreux visant le métabolisme mitochondrial des cellules cancéreuses (630).

1.4.1 Métabolisme du glucose et de la glutamine

Le glucose et la glutamine sont essentiellement les deux nutriments les plus consommés par les cellules cancéreuses (631). Ils sont tous deux utilisés pour alimenter diverses voies métaboliques et énergétiques. Les étapes précoces du catabolisme du glucose et de la glutamine peuvent être référées à la glycolyse et la glutaminolyse respectivement. L'oxydation complète du glucose et de la glutamine alimente la respiration mitochondriale via le cycle de Krebs.

1.4.1.1 Glycolyse

Le métabolisme glycolytique est universellement associé à la prolifération rapide des cellules normales et cancéreuses (**Figure 1.13**). À cet effet, l'inhibition de la glycolyse nuit à la progression tumorale dans des modèles murins (632). Alors que, tel que décrit, l'effet Warburg conduit à une perte importante d'énergie sous forme d'atome de carbone via le relargage extracellulaire précoce de lactate, il est proposé que celui-ci contribue au métabolisme anabolique via le maintien des pools intracellulaires de métabolites intermédiaires de la glycolyse qui alimentent les voies métaboliques de biosynthèses macromoléculaires (**Figure 1.14**) (633-635).

Une étude récente suggère également que l'effet Warburg est favorisé par les cellules cancéreuses lorsque la demande en NAD⁺ dépasse le besoin énergétique d'ATP (636). Plus précisément, la conversion du pyruvate en lactate permet la régénération de NAD⁺ requis au maintien de l'activité glycolytique (**Figure 1.14**). De façon mécanistique, le glucose, fait de 6 atomes de carbone, est consommé par les cellules via les transporteurs GLUT et métabolisé dans le cytosol par 10 réactions enzymatiques qui résultent en la génération de 2 molécules de pyruvates et un gain net de 2 molécules d'ATP (**Figure 1.14**) (637). En plus de l'ATP, la glycolyse permet la génération d'une molécule de réduite de NAD⁺, soit le NADH, pour chaque déshydrogénation du GA3P. Finalement, la conversion du pyruvate en lactate par l'enzyme LDH (lactate déshydrogénase) et son relargage dans le milieu extracellulaire qui résulte en l'acidification du milieu extracellulaire est souvent mesuré comme reflet du métabolisme glycolytique.

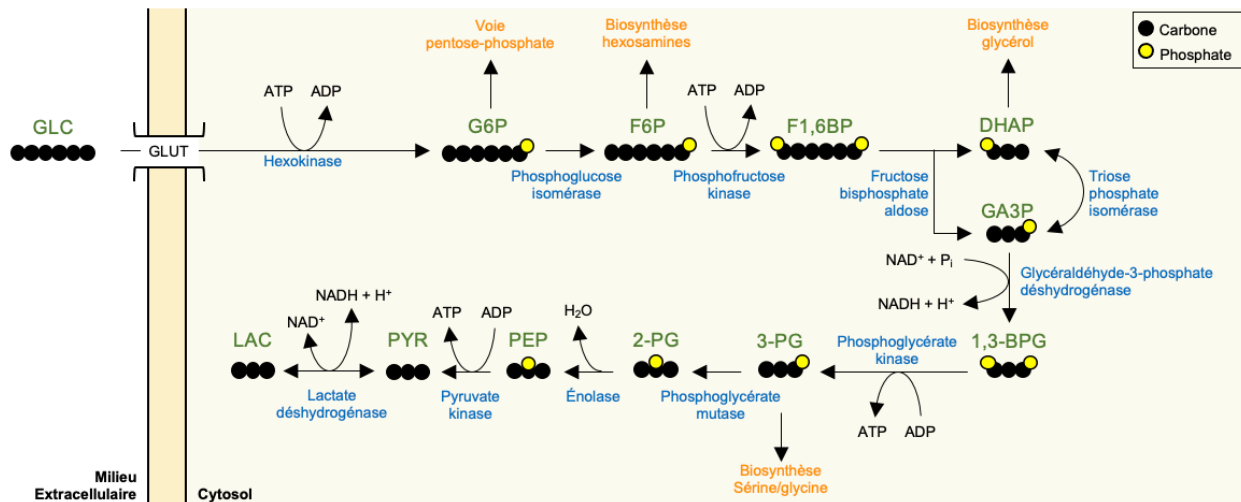


Figure 1.14 – La glycolyse. Représentation schématique des réactions enzymatiques qui composent le métabolisme glycolytique. Les enzymes sont écrites en bleu, les intermédiaires glycolytiques en vert et les voies métaboliques régulées par les métabolites en orange. GLC=glucose; G6P=glucose-6-phosphate; F1,6BP=fructose-1,6-bisphosphate; DHAP=dihydroxyacétone phosphate; GA3P=glycéraldéhyde-3-phosphate; 1,3-BPG=1,3-bisphosphoglycérate; 3-PG=3-phosphoglycérate; 2-PG=2-phosphoglycérate; PEP=phosphoénolpyruvate; PYR=pyruvate; LAC=lactate. P_i=phosphate inorganique; H⁺=hydrogène. L'activité de la LDH peut être bidirectionnelle.

1.4.1.2 Glutaminolyse

La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans la circulation sanguine et est consommée en grande quantité à des fins métaboliques et pro-tumorigéniques par les cellules cancéreuses (638-644). La glutaminolyse sert principalement à alimenter l'activité du cycle de Krebs via diverses réactions enzymatiques dites anaplerotiques. La glutamine, composée de 5 atomes de carbone, est d'abord incorporée par les cellules via le transporteur ATB (*SLC1A5*) et

convertie en glutamate dans la mitochondrie via les enzymes GLS (glutaminase; **Figure 1.15**) (638, 645, 646). Le glutamate alimente finalement l'activité du cycle de Krebs via sa conversion en α -ketoglutarate soit par l'enzyme glutamate déshydrogénase mitochondriale (*GLUD*) ou par l'enzyme aspartate aminotransférase mitochondriale (*GOT2*) (638).

1.4.1.3 Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, qui s'orchestre dans la matrice des mitochondries de toutes les cellules eucaryotes, représente l'activité d'une suite de 8 réactions enzymatiques qui sont essentielles à la libération d'énergie sous forme d'électron depuis les liens entre les atomes de carbone des intermédiaires métaboliques (**Figure 1.15**) (637). Le cycle est alimenté par le pyruvate via les transporteurs MPC (MPC1 et MPC2). En plus de la glycolyse, le pyruvate peut également être produit depuis l'oxydation réversible du lactate via la LDH, depuis la transamination réversible de l'alanine via l'enzyme ALT ainsi que depuis l'export du malate de la mitochondrie et l'activité de la malate déshydrogénase cytosolique (MDH1) (647). Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate peut être converti en acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) via le complexe PDH qui alimente le cycle de Krebs depuis sa combinaison à l'oxaloacétate dans le but de former le citrate (647). Alternativement, le pyruvate peut aussi entrer le cycle de Krebs via sa carboxylation en oxaloacétate par l'enzyme pyruvate carboxylase (PC) (647). Finalement, en plus du glucose via le pyruvate et de la glutamine via le glutamate, le cycle de Krebs peut également être alimenté en acétyl-CoA depuis la β -oxydation des acides gras (637). Les étapes et produits enzymatiques du cycle de Krebs, aussi appelé cycle de l'acide citrique (CAC) ou cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), sont décrites dans la **figure 1.15**. En résumé, l'activité du cycle de Krebs résulte en la production potentielle d'une molécule d'ATP, de 3 ou 4 molécules de NADH et d'une molécule réduite de FAD (FADH₂).

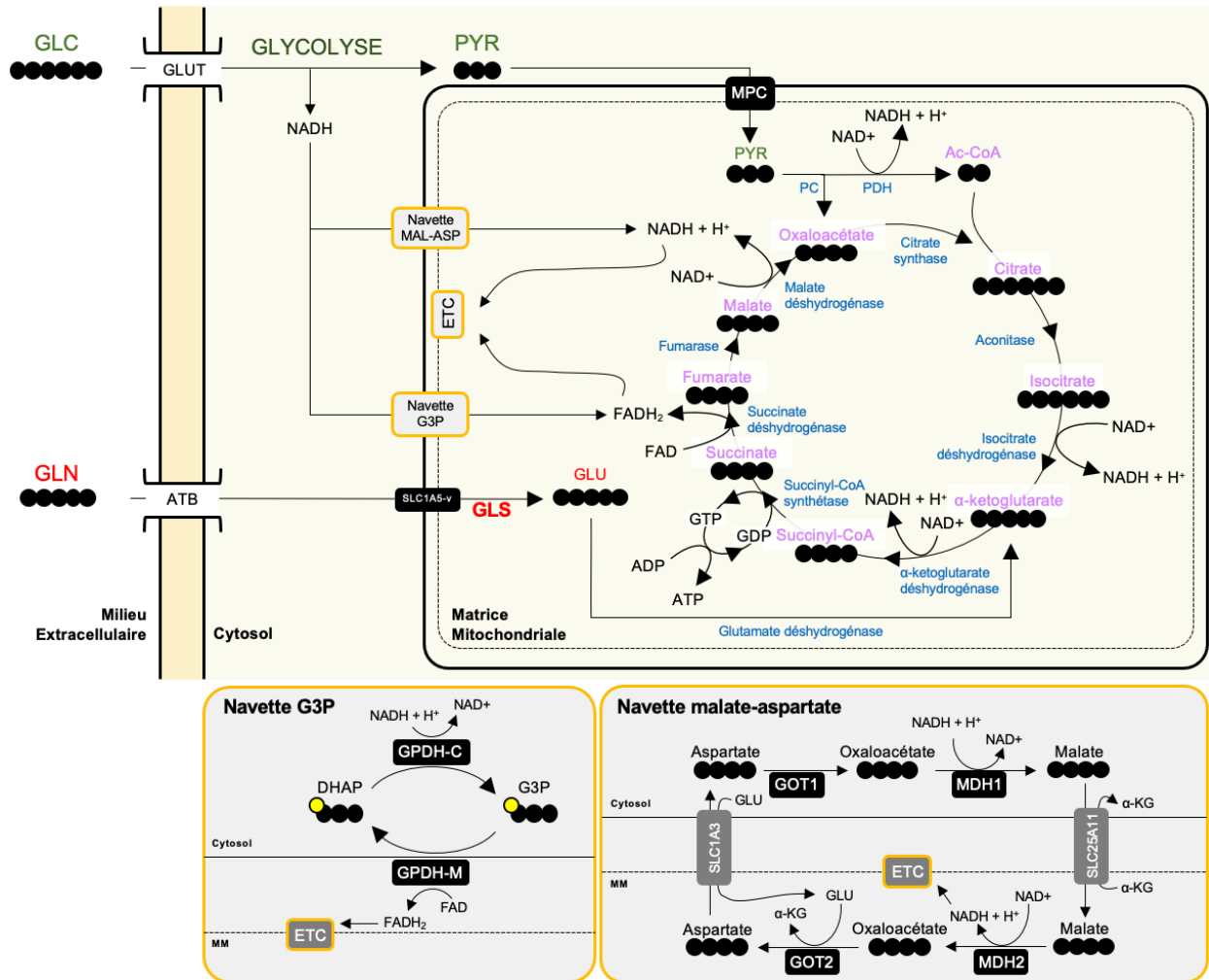


Figure 1.15 – Le cycle de Krebs. Représentation schématique des réactions enzymatiques qui composent le cycle de Krebs (rose) alimenté par la glycolyse (vert) et la glutaminolysis (rouge). Les enzymes du cycle de Krebs sont écrites en bleu. SLC1A5-v est un variant du transporteur ATB qui permet l'import de glutamine dans la mitochondrie (646). Les cofacteurs (NADH/NAD⁺ et FADH₂/FAD), les navettes mitochondriales (G3P et MAL-ASP) ainsi que la chaîne de transport d'électron (ETC) sont discutées dans la prochaine section (1.4.2). GLC=glucose; MPC=*mitochondrial pyruvate carrier*; GLN=glutamine; GLU=glutamate; GLS=glutaminase; GTP=guanosine triphosphate; GDP=guanosine diphosphate; H⁺=hydrogène; MM=matrice mitochondriale; GPDH-C=glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique; GPDH-M=glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale; G3P=glycérol-3-phosphate; DHAP=dihydroxyacétone phosphate; α-KG=α-kétoglutarate; MDH1=malate déshydrogénase cytosolique; MDH2=malate déshydrogénase mitochondriale; GOT1=aspartate aminotransférase cytosolique; GOT2=aspartate aminotransférase mitochondriale.

1.4.2 Respiration mitochondriale

Comparativement à la glycolyse, l'oxydation complète du glucose en CO₂ résulte en un gain net potentiel d'entre 36 et 38 molécules d'ATP, soit 18 ou 19 fois plus que lorsque le pyruvate n'est pas redirigé vers le cycle de Krebs (637). Des 34 ou 36 molécules d'ATP produites en aval de la glycolyse, 2 sont produites durant le cycle de Krebs et le reste est issu de l'étape ultime de la

ETC, soit la phosphorylation oxydative via l'activité de l'ATP synthase (637). L'énergie puisée du catabolisme des nutriments est emmagasinée par des cofacteurs, NADH et FADH₂, qui régulent les réactions d'oxydoréduction qui lient le cycle de Krebs à la ETC. Ce métabolisme est aussi décrit comme étant la respiration mitochondriale où l'oxygène agit comme accepteur final d'électrons au niveau de la ETC. Enfin, plusieurs études démontrent que le métabolisme mitochondrial est essentiel à la progression tumorale chez la souris et l'humain (648-655).

1.4.2.1 Les réactions d'oxydoréduction

L'activité catabolique du cycle de Krebs est possible seulement en condition aérobie de par la relation entre la ETC et les cofacteurs requis aux réactions enzymatiques du cycle. En effet, les réactions enzymatiques d'oxydoréduction s'orchestrent via le transfert d'énergie sous forme d'atomes d'hydrogène et d'électrons depuis les intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs aux cofacteurs suivants : NAD⁺ et FAD (**Figure 1.15**) (637). Ce transfert d'énergie survient une fois durant la glycolyse, lors de l'oxydation du pyruvate à l'entrée du cycle de Krebs ainsi que lors de quatre réactions enzymatiques durant le cycle de Krebs (**Figures 1.14 et 1.15**) (637). Finalement, alors que les molécules de NADH et FADH₂ produites à l'intérieur de la mitochondrie sont reconverties en formes oxydées localement via la ETC, le NADH produit dans le cytosol lors de la glycolyse est déshydrogéné soit lors de la conversion du pyruvate en lactate par la LDH ou via l'activité de navettes mitochondriales qui permettent la translocation d'énergie cytosolique sous forme d'électrons à la mitochondrie.

1.4.2.2 Les navettes mitochondriales

De façon à permettre au NADH produit durant la glycolyse de contribuer à la respiration mitochondriale, puisque la membrane mitochondriale lui est imperméable, il existe deux navettes mitochondriales : la navette du glycérol-3-phosphate (G3P) et la navette malate-aspartate. D'abord, la conversion réversible du DHAP en G3P par les enzymes GPDH (glycérol-3-phosphate déshydrogénase) cytosolique (GPDH-C) et mitochondriale (GPDH-M) permet l'oxydation du NADH en NAD⁺ dans le cytosol et la réduction du FAD en FADH₂ dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (**Figure 1.15**) (656). Alternativement, le NADH cytosolique peut transférer ses électrons à l'oxaloacétate cytosolique suivant sa conversion en malate par l'enzyme MDH1 (657). Le malate cytosolique peut ensuite être transporté dans la mitochondrie via le

transporteur SLC25A11 (en échange d'une molécule d'alpha-kétoglutarate) où il est reconverti en oxaloacétate via l'enzyme MDH2 (malate déshydrogénase mitochondriale) permettant la régénération d'une molécule de NADH (**Figure 1.15**) (657). La navette porte ainsi son nom puisque l'oxaloacétate, ne pouvant être exporté depuis la mitochondrie jusque dans le cytosol, est converti en aspartate suivant le transfert d'un groupement aminé depuis le glutamate par l'enzyme mitochondriale aspartate aminotransférase (*GOT2*) (657). L'aspartate est ensuite exporté au cytosol en échange d'une molécule de glutamate via les transporteurs SLC25A12, SLC25A13, SLC1A2 ou SLC1A3 où il est reconverti en oxaloacétate par l'enzyme cytosolique aspartate aminotransférase (*GOT1*; **Figure 1.15**) (657, 658). La navette malate-aspartate joue un rôle important dans la respiration mitochondriale des cellules cancéreuses (659-661). Son rôle dans la progression tumorale est cependant controversé. D'une part, l'inhibition de la navette malate-aspartate nuit à la croissance tumorale dans plusieurs modèles tumoraux précliniques (662-666). D'autre part, certaines études contredisent ce rôle et rapportent une association à un pronostic favorable chez les patients atteints de cancers qui présentent des déficiences de l'une ou l'autre des composantes de la navette (667-669).

1.4.2.3 La ETC et la phosphorylation oxydative

Les formes réduites (NADH et FADH₂) des cofacteurs des réactions enzymatiques d'oxydoréduction retournent à l'état oxydé via l'activité déshydrogénase de la ETC. La ETC est composée de 4 complexes (CI, CII, CIII et CIV) situés dans la membrane interne des mitochondries (**Figure 1.16**). Brièvement, le NADH libère son énergie sous forme d'électron au complexe 1 (CI) alors que le FADH₂ se fait oxyder via le complexe II (670-672). Les électrons alimentent une série de réactions d'oxydoréduction ordonnées (en ordre croissant de potentiel d'oxydo-réduction) au sein des différents complexes de la chaîne respiratoire. L'énergie libérées par chacune d'elles permettent le transport actif de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire (670). Les électrons terminent donc leur parcours au quatrième complexe où l'oxygène agit comme accepteur final d'électron car la réaction de formation de l'eau est celle qui a le plus fort potentiel d'oxydo-réduction (673). La rentrée passive de protons depuis l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale en fonction du gradient électrochimique permet l'activité rotatoire de l'enzyme ATP synthase qui effectue la phosphorylation de l'ADP en ATP, un processus appelé « phosphorylation oxydative » (OxPhos) (674, 675). Le rôle de la ETC dans

le cancer est démontré par le fait que l'absence de l'un ou l'autre des complexes limite la progression tumorale dans divers modèles précliniques (676-679).

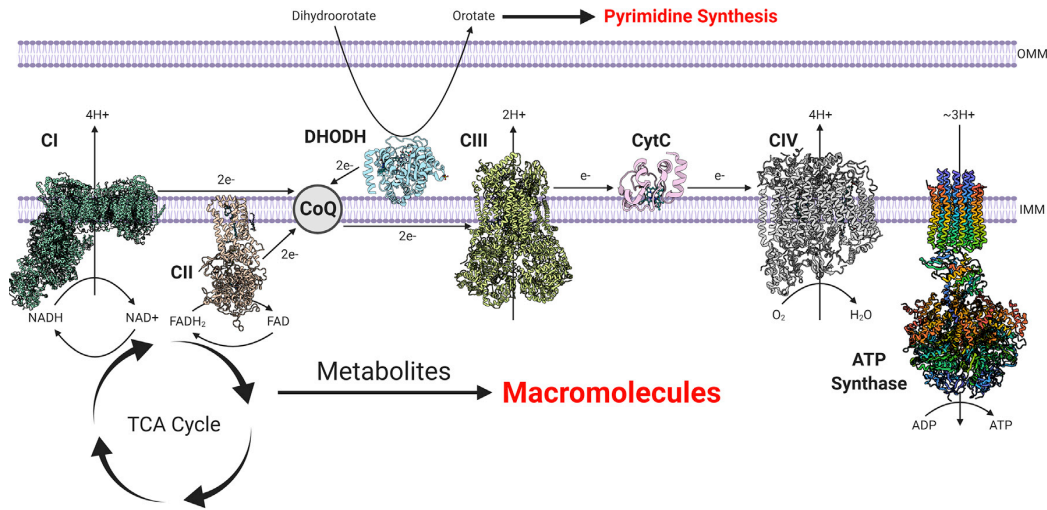


Figure 1.16 – La chaîne de transport d'électron. Représentation des structures des complexes de la ETC, de la relation avec le cycle de Krebs et de son rôle énergétique via la phosphorylation oxydative. CI=NADH déshydrogénase; CII=Succinate déshydrogénase; CIII=Cytochrome C réductase; CIV=Cytochrome C oxydase. CoQ=Coenzyme Q; CytC=Cytochrome C; e⁻=électron; H⁺=proton hydrogène; O₂=oxygène; DHODH= Dihydroorotate déshydrogénase; IMM=inner mitochondrial membrane ; OMM=outer mitochondrial membrane.

© Reproduit de Vasan et al. Science, 2020. Avec la permission de Elsevier.

1.4.2.4 La phosphorylation oxydative, l'aspartate et la prolifération cellulaire

Tout comme la glycolyse, la phosphorylation oxydative contribue à la prolifération des cellules cancéreuses. Alors que son rôle dans la prolifération est souvent associé à la production importante d'ATP, plusieurs études récentes suggèrent plutôt un rôle essentiel à la respiration mitochondriale dans la production d'aspartate, un métabolite clé dans la biosynthèse protéique et nucléotidique (658, 680-682).

À l'instar du CI de la ETC des cellules de mammifères, l'enzyme NADH déshydrogénase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (ND1), permet l'oxydation du NADH sans générer de gradient de protons utile à l'ATP synthase (683). En utilisant cette enzyme, une étude démontre que l'oxydation du NADH suffit à alimenter la prolifération des cellules cancéreuses indépendamment de la production d'ATP (684). De façon consistante, le freinage de la prolifération médié par l'oligomycine, qui bloque la respiration mitochondriale via l'inhibition de l'ATP synthase, est renversé par le FCCP qui découple le pompage de protons de l'activité de

l'ATP synthase permettant ainsi l'activité déshydrogénase du CI de la ETC en présence d'oligomycine (681).

Par ailleurs, à l'aide de la technologie CRISPR et d'une librairie de 30 000 guides d'ARN, une récente étude démontre que la perte de *GOT1* sensibilise les cellules cancéreuses à l'inhibition de la ETC (680). Plus précisément, lorsque la ETC est altérée, *GOT1* permet la synthèse d'aspartate cytosolique en présence de pyruvate, de façon à permettre la prolifération cellulaire (680). De façon consistante, l'importation d'aspartate extracellulaire via le transporteur SLC1A3 désensibilise les cellules cancéreuses à l'inhibition de la respiration mitochondriale et favorise la prolifération cellulaire (658, 665, 685). D'un point de vue mécanistique, la conversion des nutriments en aspartate nécessite l'échange d'électrons vers des accepteurs d'électrons qui sont fournis par la respiration mitochondriale, plus précisément via la régénération de NAD⁺ suivant l'oxydation du NADH au niveau du CI de la ETC (681, 682). Par exemple, l'acide alpha-cétobutyrique ainsi que le pyruvate peuvent alimenter la LDH en tant qu'accepteurs d'électron et permettre la régénération du NAD⁺ (681). Ainsi, dans les cellules dont la respiration mitochondriale est inhibée, l'ajout d'acide alpha-cétobutyrique ou de pyruvate exogène rétablit la prolifération sans pour autant rétablir la consommation d'oxygène de ces cellules (681). Enfin, sans surprise, plusieurs études démontrent que les inhibiteurs du CI de la ETC, dont la metformine, produisent une réduction de la biosynthèse intracellulaire d'aspartate (658, 680, 682, 686). Notamment, l'activité thérapeutique de la metformine est hautement dépendante des facteurs de l'environnement tumoral qui influencent la respiration mitochondriale, la régénération de NAD⁺ et la synthèse d'aspartate (682).

1.4.2.5 La phosphorylation oxydative et les fonctions pro-tumorigéniques des cellules cancéreuses

Le métabolisme OxPhos pose un frein à la thérapie anti-cancéreuse à plusieurs niveaux. En effet, plusieurs études rapportent une augmentation du métabolisme OxPhos dans les populations de cellules souches hématopoïétiques (687), du cancer du pancréas, du foie, du glioblastome, du poumon et du sein de façon à maintenir leurs fonctions initiatrices de tumeurs et d'augmenter leur survie (688-694). La phosphorylation oxydative est également augmentée dans les cellules cancéreuses résistantes à la chimiothérapie (694-697). De plus, l'inhibition de BRAF (vemurafenib), de c-KIT (imatinib) et de BTK (ibrutinib) dans les mélanomes, les tumeurs gastro-

intestinales et les lymphomes à cellules du manteau (MCL) respectivement augmente la dépendance des cellules cancéreuses au métabolisme OxPhos, ce faisant contribuant à leur résistance à ces thérapies ciblées (698-701). Enfin, le métabolisme OxPhos est aussi fréquemment associé à la dissémination métastatique (655, 702-706).

1.4.3 Le nicotinamide dinucléotide

Le NAD⁺ est une molécule essentielle à divers processus physiologiques. De façon structurale, le NAD⁺ est composée d'une molécule d'AMP liée à une molécule de nicotinamide riboside (NR) phosphorylée appelée nicotinamide mononucléotide (NMN) (**Figure 1.17**). Le NAD⁺ est retrouvé dans divers compartiments intracellulaire et en plus de son rôle dans le métabolisme, le NAD⁺ est utilisé comme substrat dans plusieurs réactions enzymatiques non oxydoréductives qui sont impliquées dans la réparation de l'ADN, la signalisation cellulaire, les réponses inflammatoires, la sénescence et l'apoptose (707, 708). Le NAD⁺ peut aussi être sécrété dans le milieu extracellulaire où il est métabolisé et recyclé par diverses ecto-enzymes dont CD38, CD203a, CD157 et ARTC (709). Notamment, l'activité enzymatique de CD38 contribue largement à la déplétion des niveaux intracellulaires de NAD⁺ associée au vieillissement (302, 710-712).

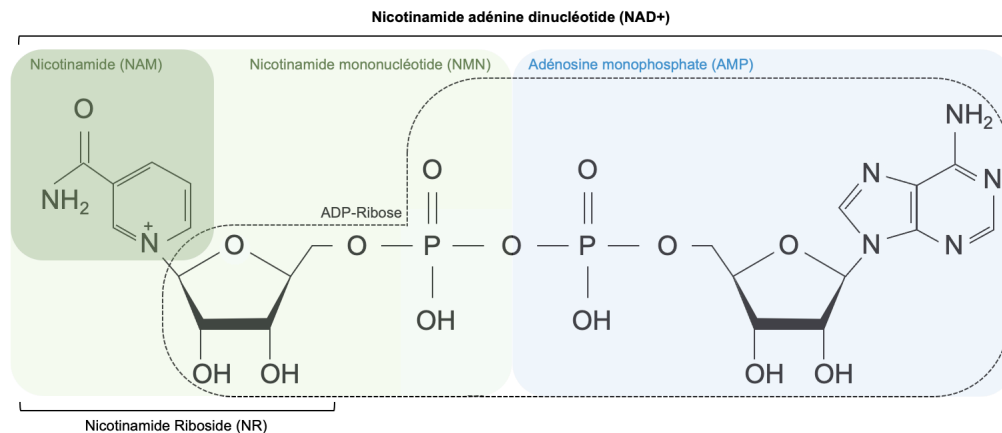


Figure 1.17 – Composantes moléculaires et structurales du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) et ses dérivés.

1.4.3.1 Voies de synthèses du NAD⁺

Trois voies de synthèse sont impliquées dans la génération intracellulaire de NAD⁺ : la voie de synthèse *de novo*, la voie de synthèse Preiss-Handler et la voie de récupération de la synthèse du NAD⁺ (**Figure 1.18**). La synthèse *de novo* s'initie à partir de l'apport nutritionnel en

tryptophan (Trp) qui est converti en acide nicotinique mononucléotide (NAMN) par une suite de réactions enzymatiques (713). Alternativement, le NAMN peut aussi provenir directement de l'acide nicotinique (NA) via l'enzyme NAPRT (NA phosphoribosyltransférase) (714). Le NAMN est ensuite converti en NAAD (NA adénine dinucléotide) via les enzymes NMNATs (NMN adenylyltransférases) et puis finalement en NAD⁺ via la NADS (NAD synthase) (715). Finalement, en comparaison à la synthèse *de novo*, le recyclage du nicotinamide (NAM) libéré par les enzymes qui utilisent le NAD⁺ comme substrat contribue majoritairement à la biosynthèse de NAD⁺ (707). Le NAD⁺ étant un important substrat d'enzymes telles que les PARPs et SIRTs qui utilisent l'unité ADP-ribose afin de permettre les processus de PARylation et de déacétylation respectivement, son recyclage est essentiel à la reconstitution des pools de NAD⁺ (715). En effet, le NAM peut être reconverti en NAD⁺ suivant deux réactions enzymatiques consécutives via les enzymes NAMPT (NAM phosphoribosyltransférase) et NMNATs (715).

Le métabolisme extracellulaire du NAD⁺ et ses dérivés contribuent à la biosynthèse intracellulaire du NAD⁺ via la voie de récupération. Alors que les membranes cellulaires sont considérées imperméables aux imposantes molécules comme le NAD⁺ et le NMN, le transport intracellulaire de la forme non-phosphorylé (NR) permet la reconstitution des pools intracellulaires de NMN et NAD⁺ via l'enzyme nicotinamide riboside kinase (NRK) (716-719). En bref, le Trp, mais principalement le NA, NAM et NR sont considérés comme d'importants précurseurs de la biosynthèse de NAD⁺ via les diverses voies de biosynthèses (**Figure 1.18**).

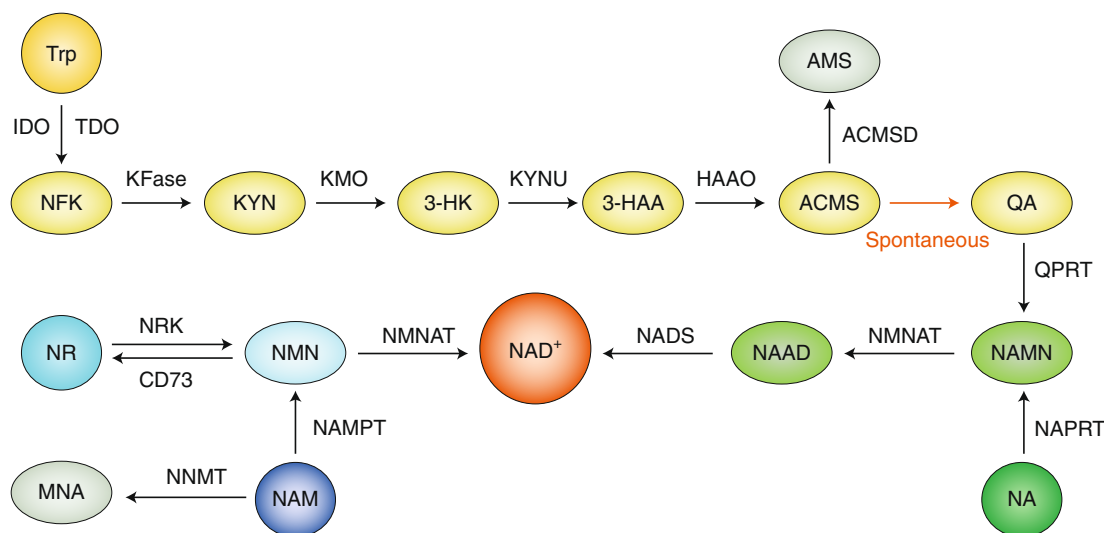


Figure 1.18 – Les voies de biosynthèse du NAD⁺. Représentation schématique des voies de synthèse *de novo* (jaune), Preiss-Handler (vert) et de récupération (bleu) du NAD⁺. Les métabolites intermédiaires sont présentés dans les bulles et les enzymes qui catalysent les réactions sont présentées au-dessus/à côté des flèches. Trp=tryptophan; IDO=indoléamine-2,3-dioxygénase; TDO=tryptophan-2,3-dioxygénase; NFK=*N*-formylkynurénine; KFase=kynurénine formamidase; KYN=kynurénine; KMO=kynurénine 3-mono-oxygénase; 3-HK=3-hydroxykynurénine; KYNU=kynuréninase; 3-HAA=acide 3-hydroxyanthranilique; HAAO=acide 3-hydroxyanthranilique dioxygénase; AMS=2-aminomuconique-6-semialdéhyde; ACMS=2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdéhyde; ACMSD=ACMS décarboxylase; QA=acide quinoléique; QPRT=quinolinate phosphoribosyltransférase; NA=acide nicotinique; NAMN=NA mononucléotide; NAPRT= NA phosphoribosyltransférase; NMN=nicotinamide mononucléotide; NMNAT=NMN/NAMN adénylyltransférase; NAAD=NA adénine dinucléotide; NAD⁺=nicotinamide adénine dinucléotide; NADS=NAD⁺ synthase; NR=nicotinamide riboside; NRK=NR kinase; MNA=1-méthyl-nicotinamide; NAM=nicotinamide; NNMT=NAM N-méthyltransférase; NAMPT=NAM phosphoribosyltransférase.

© Reproduit de Katsyuba et al. Nat Metab, 2020. Avec la permission de Springer Nature.

1.4.3.2 CD73 et le recyclage extracellulaire du NAD⁺

Un rôle de CD73 dans le recyclage extracellulaire du NAD⁺ est rapporté par plusieurs études via la déphosphorylation de NMN en NR (**Figure 1.18**). D’abord, l’enzyme CD73 humaine partage une importante homologie structurelle à l’enzyme NadN (NAD⁺ nucleotidase) présente dans la bactérie *Haemophilus influenzae* (720). Tout comme NadN, cette étude rapporte une activité enzymatique de l’ecto-nucléotidase CD73 humaine dans le métabolisme extracellulaire du NAD⁺ via sa conversion en NMN et AMP et la déphosphorylation subséquente en NR et ADO respectivement (720). La déphosphorylation du NMN en NR est subséquentement reproduite en utilisant plusieurs formes de protéines recombinantes humaines de CD73 (721). Une récente étude ne reproduit cependant pas l’activité nucléotidase de CD73 sur le NAD⁺ et rapporte une activité hydrolytique minimale pour le substrat NMN en comparaison à l’AMP (722). Néanmoins, consistant avec un rôle dans la production de précurseurs extracellulaires à la biosynthèse intracellulaire de NAD⁺ via l’hydrolyse du NMN en NR (718), deux études suggèrent que l’inhibition de CD73 sensibilise les cellules cancéreuses à un inhibiteur de NAMPT, soit le FK866 (717, 723). En effet, ces études rapportent une plus grande efficacité du FK866 à diminuer la viabilité et la synthèse

intracellulaire de NAD⁺ en présence de NMN extracellulaire lorsque l'enzyme CD73 est inhibée *in vitro*, ainsi que dans un modèle murin de xéno greffes de cancer ovarien humain (717, 723). Une récente étude contredit toutefois certaines de ces observations. En effet, l'étude rapporte que l'absence de CD73 sur la lignée cancéreuse MCF-7 ne potentialise pas l'efficacité du FK866 à diminuer la synthèse intracellulaire de NAD⁺ (722). Néanmoins, malgré une affinité moindre pour le NMN ($K_m=1371\mu\text{M}$) que pour l'AMP ($K_m=116.6\mu\text{M}$), une autre étude confirme l'activité enzymatique *in vitro* de CD73 sur l'hydrolyse du NMN en NR, sur 2 lignées de cellules épithéliales humaines (724). De plus, *in vitro*, l'inhibition de CD73 annule l'augmentation du niveau intracellulaire de NAD⁺ dans les cellules qui sont supplémentées de NMN, mais n'annule pas l'augmentation médiée par le NR dans deux études indépendantes (718, 724). Finalement, dans un modèle de vasodilatation *ex vivo* d'anneau aortique, l'étude démontre que la conversion du NMN en NR par CD73 est importante pour prévenir la dysfonction endothéliale induite par l'angiotensine II (724).

1.4.3.3 Compartimentation du NAD⁺ intracellulaire

Le NAD⁺ intracellulaire est réparti dans plusieurs organelles. Le pool mitochondrial est le plus important avec plus de 50% de tout le NAD⁺ intracellulaire et est essentiel au métabolisme cellulaire (725). La reconstitution du pool de NAD⁺ mitochondrial peut s'effectuer de deux façons. D'abord le NAD⁺ cytosolique peut être transporté directement dans la mitochondrie via le transporteur MCART1 (726-729). Ensuite, il est aussi suggéré que les pools de NAD⁺ mitochondrial peuvent être reconstitués localement via l'import du précurseur NMN et l'activité de l'isoforme mitochondrial de l'enzyme NMN adenylyltransférase (NMNAT3) (719, 725, 726, 730).

Le pool nucléaire de NAD⁺, régénéré localement via la NMNAT1, est principalement important pour l'activité des PARPs et des SIRT. En effet, suivant des dommages à l'ADN, l'activation de PARP1 mène à la consommation de 80% du pool nucléaire de NAD⁺ pour permettre l'ADP-ribosylation aussi appelée « PARylation » faisant référence à la production de chaînes de poly-ADP-ribose (PAR) (731). Plusieurs isoformes des SIRT (SIRT1, SIRT2, SIRT6, SIRT7) sont présentes dans le noyau et contribuent à la régulation de la structure de la chromatine et à la stabilité génomique (732).

Enfin, le compartiment cytosolique de NAD⁺, localement synthétisé via l'isoforme NMNAT2, sert de moyeu central régulant les autres pools intracellulaires (725, 733). En plus de contribuer à la compartimentation intracellulaire, le NAD⁺ cytosolique est important pour la glycolyse et l'activité de SIRT₁ cytosoliques et explique le rôle central que joue cette molécule dans le fonctionnement et à la survie des cellules cancéreuses (634, 734-736).

1.4.4 Le métabolisme cellulaire et les thérapies anti-cancéreuses

De par son rôle pivot dans la prolifération et les fonctions pro-tumorigéniques des cellules cancéreuses, le métabolisme cellulaire comme cible thérapeutique en cancer constitue un domaine effervescent en recherche. D'abord, puisque la caractérisation de l'effet Warburg laissait initialement sous-entendre un dysfonctionnement mitochondrial, les efforts dirigés pour le développement d'inhibiteurs métaboliques des cellules cancéreuses se sont initialement concentrés sur le métabolisme glycolytique. Néanmoins, les travaux des dernières décennies sur la contribution des mitochondries à la progression tumorale ont stimulé l'intérêt du développement d'inhibiteurs du métabolisme oxydatif et de la glutaminolyse.

1.4.4.1 Inhibiteurs de la glycolyse et de la glutaminolyse

Les inhibiteurs glycolytiques étudiés en cancer interviennent à différentes étapes de la glycolyse, notamment via l'inhibition des transporteurs GLUT (737-743), via l'inhibition de l'hexokinase II (744-751) ainsi que via l'inhibition de la pyruvate kinase M2 (752, 753). Via son rôle anaplérotique, la glutaminolyse palie à la génération de macromolécules importantes issues du cycle de Krebs dans les cellules cancéreuses hautement glycolytiques où le pyruvate est principalement converti en lactate. Des inhibiteurs de la glutaminolyse qui altèrent l'activité des GLS (CB839, JHU083, compound 968, BPTES) (655, 754-760) et de certains mutants d'isocitrate déshydrogénases (AGI-6780, AGI-5198) (761-765) se sont montrés efficaces seuls et en combinaison dans divers modèles tumoraux précliniques. Étonnamment, l'inhibition du métabolisme de la glutamine produit différents effets dans les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires. En effet, l'activité thérapeutique de l'inhibition de GLS1 résulte de la diminution de l'activité métabolique générale des cellules tumorales et d'une augmentation du métabolisme OxPhos dans les lymphocytes T effecteurs (754). Enfin, certains inhibiteurs métaboliques de la

glycolyse et de la glutaminolyse offrent une efficacité thérapeutique anti-tumorale améliorée lorsque combinés à la chimiothérapie (755, 757, 766-769), à des inhibiteurs de tyrosine kinases (747, 758, 770, 771), à des inhibiteurs de protéines de survie (772) et à des inhibiteurs de points de contrôle immunologique (754).

1.4.4.2 La metformine et l'inhibition du complexe I de la ETC

La metformine est surtout connu pour son activité thérapeutique dans le traitement du diabète de type 2 via l'inhibition de la gluconéogenèse hépatique. En 2005, une étude rétrospective suggère que son utilisation est associée à une réduction de l'incidence des cancers (773). Plusieurs études rapportent ensuite un risque réduit de l'incidence de plusieurs cancers communs tels que le cancer colorectal, du pancréas, du foie, du sein et du poumon avec l'utilisation de la metformine (774). *In vitro* et *in vivo*, la metformine nuit à la progression tumorale de plusieurs lignées cancéreuses (670). Plusieurs mécanismes d'actions peuvent expliquer son potentiel thérapeutique anti-cancéreux, mais celui-ci est plus particulièrement attribué à l'inhibition de la respiration mitochondriale (775). En 2000, deux études révèlent un rôle préalablement inconnu de la metformine dans l'inhibition du CI de la ETC (776, 777). L'activité anti-cancéreuse de la metformine est principalement tributaire de cette fonction inhibitrice de la NADH déshydrogénase. En effet, l'expression de la sous-unité *NDII* résistante à la metformine dans les cellules cancéreuses annule l'activité thérapeutique de la metformine *in vitro* et *in vivo* (684). Étant donné l'importance de la phosphorylation oxydative pour les CSC, plusieurs études rapportent également un rôle de la metformine dans l'inhibition des fonctions de ces cellules (778, 779). Plusieurs facteurs influencent et limitent l'efficacité thérapeutique de la metformine dont la composition du microenvironnement tumoral et l'expression du transporteur OCT3 qui facilite l'import de la metformine dans les cellules (670, 682, 780-783). Enfin, quelques essais cliniques suggèrent un potentiel thérapeutique intéressant pour l'utilisation de la metformine en cancer. Dans un essai clinique de phase 2 sur 139 patients atteints du cancer du poumon avec mutation du récepteur EGFR, la combinaison d'un inhibiteur de protéine tyrosine kinase (erlotinib, afatinib ou gefitinib) à la metformine prolonge la survie globale et sans progression (784). Une autre étude de phase 2 sur 38 patientes atteintes du cancer de l'ovaire révèle que la metformine diminue de moitié le nombre de CSC (785). Les auteurs notent également une survie meilleure qu'attendue, sans groupe comparateur néanmoins (785). Toutefois, d'autres études rapportent aucune valeur ajoutée à la

metformine dans le traitement du cancer du sein (786, 787). L'approfondissement de nos connaissances concernant les mécanismes d'actions de la molécule et les déterminants génétiques qui sensibilisent les cellules cancéreuses à la metformine permettra de mieux définir les populations de patients susceptibles de présenter une réponse thérapeutique.

1.4.4.3 Inhibiteurs de la ETC et de la phosphorylation oxydative

L'importance du métabolisme OxPhos chez l'humain est notamment démontrée par une analyse de profilage métabolique au niveau transcriptionnel d'une large cohorte de patients atteints de divers cancers qui révèle une augmentation de cette voie métabolique dans les tissus tumoraux comparativement au stroma et aux tissus normaux (788). En plus de la metformine, d'autres inhibiteurs de la phosphorylation oxydative ont démontré une activité thérapeutique anti-cancéreuse potentielle *in vitro* et *in vivo* dont le VLX600 (inhibiteur des CI, CII et CIV) (789), l'IACS-010759 (inhibiteur du CI) (701), le BAY87-2243 (inhibiteur du CI) (698), le ME-344 (inhibiteur du CI) (790) ainsi que la phenformine (inhibiteur du CI), un biguanide de la même famille que la metformine (791). Aussi, plusieurs études suggèrent une activité thérapeutique augmentée lorsque l'inhibition du métabolisme OxPhos est combinée à d'autres thérapies anti-cancéreuses telles que certaines chimiothérapies (irinotécan, cisplatine, doxorubicine) (789, 792), certains inhibiteurs des protéines tyrosine kinases (imatinib, ibrutinib, vemurafenib, nintedanib, dovitinib, regorafenib) (698, 700, 701, 793) et certaines immunothérapies (anti-PD-1, anti-CTLA-4) (794-796).

1.4.4.4 Inhibiteurs des PARPs

De par le rôle central du NAD⁺ dans le fonctionnement des enzymes PARPs impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN, plusieurs inhibiteurs des PARPs (olaparib, rucaparib, niraparib, talazoparib) sont utilisés comme thérapie anti-cancéreuse. L'inhibition de PARP est particulièrement efficace dans les cancers déficients dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (mutés pour *BRCA1/2*). En effet, en emprisonnant PARP aux sites de dommages et en l'empêchant de faire la PARylation nécessaire au relâchement de la chromatine et le recrutement de protéines impliquées dans la réparation des bris d'ADN, l'inhibition de PARP induit la mort cellulaire via l'accumulation de bris double et simple brin (797, 798). De façon intéressante, il a été suggéré que le métabolisme OxPhos soit particulièrement important à la survie

des cellules endommagées par des agents cytotoxique en limitant la déplétion des niveaux d'ATP médiée par l'activité de PARP1 (799). De plus, le métabolisme mitochondrial oxydatif est augmenté dans les cellules cancéreuses qui présentent des déficiences dans les mécanismes de réparation homologue et qui dépendent de PARP (800). De façon consistante, l'inhibition (FK866) de l'enzyme limitante de la biosynthèse intracellulaire du NAD⁺ (NAMPT) sensibilise les cellules du TNBC à l'inhibition de PARP (801).

1.4.5 L'axe adénoenergique et le métabolisme cellulaire

Le rôle de l'axe adénoenergique, s'il y a lieu, dans la régulation du métabolisme cellulaire n'est pas totalement compris. D'abord, une étude rapporte un rôle du récepteur A2a dans la régulation positive d'enzymes impliquées dans le métabolisme glycolytique des cellules endothéliales de la rétine via la régulation du facteur de transcription HIF-1 α en aval de l'activation d'ERK et Akt (802). Enfin, d'autres études, discutée dans les sections qui suivent, rapportent un rôle probable de la signalisation adénoenergique dans la biogénèse mitochondriale des cellules cancéreuses ainsi que dans l'activation métabolique de certaines cellules immunitaires.

1.4.5.1 La signalisation adénoenergique et le facteur de transcription PGC1 α

PGC1 α est un important co-activateur transcriptionnel impliqué dans la biogénèse mitochondriale via l'activation des protéines mtTFA (*TFAM*), NRF1 et NRF2 qui régulent la réplication de l'ADN mitochondrial (803). De façon intéressante, une étude a démontré que le dbcAMP, un analogue de cAMP, augmentait le métabolisme OxPhos via l'activité de PGC1 α , suggérant que la signalisation adénoenergique joue un rôle dans la biogénèse mitochondriale des cellules cancéreuses (804). Finalement, il a aussi été démontré que l'activation de la voie de cAMP-PKA induit la déacétylation et l'activation de PGC1 α via la phosphorylation de l'unité catalytique de l'enzyme SIRT1 (805).

1.4.5.2 L'axe adénoenergique et le métabolisme des cellules cancéreuses

D'abord, chez les patients atteints de la leucémie myéloïde aiguë (AML), l'expression et l'activité de l'ecto-nucléotidase CD39 sont augmentées par la chimiothérapie sur les cellules leucémiques et contribuent à la résistance à la cytarabine de ces cellules via la biogénèse de mitochondries (806). En effet, les cellules leucémiques déficientes pour CD39 présentent des

niveaux réduits d'expression des complexes de la ETC et un profil métabolique OxPhos diminué (806). De façon mécanistique, l'étude révèle que CD39 contribue au métabolisme OxPhos et à la résistance à la cytarabine des cellules leucémiques via la signalisation dépendante de cAMP et PKA qui mène à l'activation du régulateur de la biogénèse mitochondriale PGC1 α (806). De façon similaire, l'activation de la voie de signalisation dépendante de cAMP et PKA via la forskoline favorise le métabolisme OxPhos via la fusion mitochondriale dans des fibroblastes murins (NIH3T3) transformés avec un oncogène K-Ras ainsi que dans des cellules du TNBC (MDA-MB-231) (807). Cependant, le rôle de CD73 dans la régulation du métabolisme oxydatif des cellules cancéreuses n'a pas été directement étudié.

1.4.5.3 L'adénosine et le métabolisme des cellules immunitaires

Les fonctions immunosuppressives de CD73 et l'adénosine sont déjà largement décrites sur plusieurs types de cellules immunitaires. Quelques études se sont également intéressées au rôle de l'axe adénosinergique dans l'activation métabolique de diverses cellules immunitaires. D'abord, dans les lymphocytes T CD8, l'absence de l'enzyme CD73 augmente l'incorporation de glucose l'expression de l'hexokinase II (808). Cette même étude rapporte plutôt un rôle négatif de CD73 sur le métabolisme OxPhos de ces cellules (808). De façon similaire, une autre étude démontre que la signalisation dépendante de l'activation de PKA en aval du récepteur A2a nuit à l'activité glycolytique et mitochondriale des lymphocytes T CD8 (108). Par ailleurs, une étude récente démontre que l'inosine, le produit de dégradation de l'adénosine, peut être utilisée par les lymphocytes T comme source alternative de carbones (809). En effet, lorsqu'ils sont activés *in vitro* en absence de glucose, l'inosine peut être métabolisé par l'enzyme PNP de sorte à alimenter le métabolisme requis à la prolifération et au fonctionnement des lymphocytes T (809). Plus encore, l'étude démontre que la supplémentation d'inosine augmente l'efficacité thérapeutique d'immunothérapies dépendantes de l'activité des lymphocytes T *in vivo* (809). Finalement, l'adénosine réduit légèrement le métabolisme OxPhos des cellules NK stimulées à l'IL-12 et l'IL-15 *in vitro* (810).

1.4.6 Synthèse du chapitre

En résumé, l'activité métabolique régule plusieurs fonctions importantes à la tumorigénicité des cellules cancéreuses. Contrairement aux croyances populaires vis-à-vis l'effet

Warburg, non seulement l'activité mitochondriale est-elle maintenue dans la plupart des cellules cancéreuses, mais celle-ci est aussi essentielle à la prolifération, la survie, la résistance aux thérapies et à la dissémination métastatique de plusieurs types de cellules cancéreuses. De plus, de façon intéressante, plusieurs études suggèrent que la génération d'ATP n'est pas essentielle à la prolifération favorisée par la respiration mitochondriale. Alors que plusieurs facteurs influencent l'activité métabolique des cellules cancéreuses, le NAD⁺ occupe un rôle central dans l'oxydation des nutriments et la tumorigénicité des cellules cancéreuses. De façon intrigante, plusieurs études rapportent un rôle largement inexploré de CD73 dans la voie de récupération de la biosynthèse de NAD⁺ intracellulaire. Le rôle de la signalisation adénosinergique et CD73 dans la régulation du métabolisme cellulaire demeure toutefois largement incompris. Enfin, l'identification de voies métaboliques modulables à des fins thérapeutiques en cancer est d'un intérêt grandissant.

Chapitre 2 – Hypothèses, objectifs et présentation des projets

Les projets qui constituent cette thèse s'articulent autour d'un sujet central commun et de deux thèmes principaux : les fonctions immunologiques (#1) et non-immunologiques (#2) de l'enzyme CD73 (sujet central). Dans le premier thème, cette thèse s'intéresse aux fonctions physiologiques (5.1) et pathologiques (5.2) de CD73 sur les lymphocytes B, soit dans des modèles murins d'immunisation contre *S. pneumoniae* (5.1) et de leucémie lymphoïde chronique (5.2) respectivement. Le projet qui compose le second thème, quant à lui, s'intéresse aux fonctions pro-tumorigéniques de CD73 qui sont indépendantes de l'immunité anti-tumorale, mais qui gravite plutôt autour du métabolisme des cellules cancéreuses (5.3).

2.1 CD73-A2a et la vaccination à polysaccharides contre *S. pneumoniae*

Avec le premier projet, cette thèse explore les fonctions basales de CD73 dans la commutation isotypique des lymphocytes B de type inné et plus spécialement le rôle de CD73 dans l'immunisation systémique contre la bactérie *S. pneumoniae*.

2.1.1 Hypothèses et objectifs

Il est connu que les jeunes enfants et les adultes atteints d'immunodéficiences communes sont susceptibles de moins bien répondre à la vaccination par PPV23. Par ailleurs, les lymphocytes B chez ces populations de patients affichent une expression CD73 en deçà de la normale, suggérant une déficience de l'axe adénosinergique. Cependant, le rôle de CD73 et de l'adénosine dans le processus d'immunisation contre *S. pneumoniae* demeure encore inconnu. Le premier projet teste donc l'hypothèse (#1) suivante :

1. CD73 et l'adénosine contribue à la commutation isotypique requise à l'immunisation contre *S. pneumoniae* via le récepteur A2a suivant la vaccination avec le PPV23.

Pour répondre à l'hypothèse, l'étude s'est intéressée aux objectifs suivants :

- a. Étudier le profil d'expression de CD73 et l'impact de l'absence génétique de CD73 sur l'ontogénie des lymphocytes B murins.

- b. Étudier le rôle de CD73 et A2a dans la commutation isotypique suivant la vaccination de souris avec le PPV23.
- c. Étudier la susceptibilité à une infection systémique de *S. pneumoniae* des souris déficientes pour CD73 ou A2a.
- d. Étudier le potentiel thérapeutique de la signalisation A2a suivant la vaccination au PPV23 dans des jeunes souris.

2.1.2 Présentation du 1^{er} article

Le premier article qui compose cette thèse et qui s'intitule « *CD73-A2a adenosine receptor axis promotes innate B cell antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccination* » a été publié en janvier 2018 dans la revue *PLOS one*. L'ordre et les rôles des auteurs se répartissent ainsi :

1. David Allard : Conception générale et design expérimental, acquisition et analyses des données (figures 6.3, 6.4, 6.5, S6.1, S6.3), formatage des figures et de la table, écriture et révision du manuscrit.
2. Roxanne Charlebois : Design expérimental, acquisition et analyses des données (figures 6.1, 6.2, S6.1, S6.2 et table 1), écriture du manuscrit.
3. Loise Gilbert : Aide à l'acquisition des données (figures 6.2C, 6.3C, 6.4C, 6.5C, S6.1A et table 1).
4. John Stagg* : Conception générale et design expérimental, écriture et révision du manuscrit, supervision et administration du projet, responsable du financement.
5. Pavel Chrobak* : Conception générale et design expérimental, aide dans l'acquisition et l'analyses des données (figures 6.1, 6.2C, 6.3C, 6.4C, 6.5C, S6.1, S6.2, S6.3), écriture et révision du manuscrit, supervision et administration du projet.

* John Stagg et Pavel Chrobak ont co-supervisés l'étude équitablement.

2.2 CD73 dans la leucémie lymphoïde chronique

Avec le second projet, cette thèse explore le rôle de CD73 dans la pathogénèse de la leucémie lymphoïde chronique à l'aide d'un modèle de souris transgéniques.

2.2.1 Hypothèses et objectifs

Certaines études rapportent une valeur pronostique de CD73 et CD39 et un rôle biologique du récepteur A2a dans la LLC. Alors que la signalisation adénosinergique dans la pathogénèse de la LLC a principalement été étudiée *in vitro*, une étude récente suggère que l'inhibition du récepteur A2a puisse produire une activité thérapeutique potentielle en modulant l'environnement immunitaire *in vivo* (617). Néanmoins, avec un modèle de LLC murine par transfert adoptif de cellules leucémiques, cette inhibition du récepteur A2a ne ralentit pas la progression tumorale (617). Le second projet teste donc l'hypothèse (#2) suivante :

2. CD73 exerce un rôle pro-tumorigénique dans la pathogénèse de la LLC.

Pour répondre à l'hypothèse, l'étude s'est intéressée aux objectifs suivants :

- a. Étudier le profil d'expression de CD73 en relation avec l'évolution de la leucémie dans un modèle transgénique de LLC murine.
- b. Étudier l'impact de l'absence de CD73 dans la progression tumorale dans un modèle transgénique de LLC murine.
- c. Étudier l'impact de l'absence de CD73 sur les mécanismes immunitaires anti-tumoraux dans un modèle transgénique de la LLC murine.
- d. Étudier le profil d'expression de CD73 en relation avec l'évolution de la leucémie humaine sur des échantillons de patients.

2.2.2 Présentation du 2^e article

Le second manuscrit qui compose cette thèse et qui s'intitule « *CD73 promotes chronic lymphocytic leukemia in mice* » a été soumis à la revue *Blood Advances* le 22 juillet 2021. L'ordre et les rôles des auteurs se répartissent ainsi :

1. David Allard : Conception générale et design expérimental, acquisition et analyses des données de toutes les figures (figures 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, S7.1, S7.2, S7.3, S7.4, S7.5, S7.6), formatage des figures et de la table, écriture du manuscrit.
2. Pavel Chrobak : Conception générale et design expérimental, aide technique dans l'acquisition et l'analyses des données de cytométrie en flux (figures 7.2, 7.3, 7.4, S7.6).
3. Priscilla Tessier : Aide technique dans l'expérimentation animale et l'élevage des colonies, aide dans l'acquisition des données de expériences de survie (figures 7.2, 7.3, S7.4).
4. Marjorie A. Bergeron : Aide technique à l'acquisition des données de cytométrie en flux (figures 7.1, 7.2, S7.1, S7.3).
5. Nathalie Johnson : A fourni les échantillons de patients humains utilisés pour les figures 7.4 et S7.6, révision du manuscrit.
6. John Stagg : Conception générale et design expérimental, écriture et révision du manuscrit, supervision et administration du projet, responsable du financement.

2.3 CD73 dans le métabolisme des cellules cancéreuses

Avec le troisième projet, cette thèse explore les rôles pro-tumorigéniques de CD73 via la régulation du métabolisme des cellules cancéreuses.

2.3.1 Hypothèses et objectifs

Plusieurs études suggèrent que CD73 favorise la progression tumorale indépendamment de son activité immunosuppressive. Certaines études suggèrent que la signalisation adénosinergique puisse réguler la biogénèse mitochondriale des cellules tumorales. D'autres études suggèrent un rôle négatif de l'adénosine sur l'activité métabolique des cellules immunitaires avec des conséquences potentiellement nuisibles sur l'immuno-surveillance. Enfin, alors que le NAD⁺ joue un rôle central dans plusieurs processus physiologique, dont l'activité métabolique cellulaire, le rôle de l'activité enzymatique de CD73 sur le NMN et la voie de récupération de la biosynthèse intracellulaire de NAD⁺ demeure largement incompris. Le rôle de CD73 dans la régulation métabolique cellulaire est inconnu, mais s'il est conséquent, pourrait expliquer certaines fonctions pro-tumorigéniques de l'enzyme CD73 qui sont indépendantes de l'activité immunosuppressive de l'adénosine. Le troisième projet teste donc l'hypothèse (#3) suivante :

3. CD73 favorise la croissance tumorale via la régulation de l'activité métabolique des cellules cancéreuses.

Pour répondre à l'hypothèse, l'étude s'est intéressée aux objectifs suivants :

- a. Comparer le profil métabolique des cellules cancéreuses qui expriment et qui n'expriment pas CD73.
- b. Étudier le rôle de CD73 dans la respiration mitochondriale et la prolifération cellulaire.
- c. Étudier le rôle de CD73 et la signalisation adénosinergique dans la biogénèse mitochondriale
- d. Étudier le rôle de CD73 dans la voie de récupération de la biosynthèse de NAD⁺ intracellulaire et les fonctions biologiques qui en découlent.

2.3.2 Présentation du 3^e article

Le troisième manuscrit qui compose cette thèse et qui s'intitule « *CD73 promotes cellular metabolic fitness independently of adenosine signaling* » est en préparation. L'ordre et les rôles des auteurs se répartissent ainsi :

1. David Allard : Conception générale et design expérimental de toutes les figures, acquisition des données (figures 8.1A-B-C-H-J-K, 8.2, 8.3B-C-D-F, 8.4E-F, 8.5A-E-F, S8.1, S8.3, S8.6A-B-D-E) et analyse/formatage de toutes les figures, écriture du manuscrit.
2. Isabelle Cousineau : Design expérimental, acquisition et analyses des données (figures 8.1G, 8.5C-D-G, S8.6C-F), écriture du manuscrit (méthodologie).
3. Eric Ma : Design expérimental, acquisition et analyses des données (figures 8.1D-E-F, 8.3H, S8.2A-B-C-D).
4. Yacine Barèche : Analyse des données d'analyses transcriptionnelles (figures 8.3E, 8.5B, S8.2E), écriture du manuscrit (méthodologie).
5. Hubert Fleury : Aide dans l'acquisition des données de la figure 8.5A.
6. Russell Jones : Conception générale et design expérimental, révision du manuscrit, supervision.
7. John Stagg : Conception générale et design expérimental, écriture et révision du manuscrit, supervision et administration du projet, responsable du financement.

*En tant qu'auteur principal, DA s'est occupé de la conception des expériences et la préparation des échantillons biologiques des figures 8.1I, 8.3A, 8.4A-B-C-D-G et S8.4A-B, mais les données qui composent ces figures ont été générées expérimentalement et analysées par le service d'analyse de la plateforme de métabolomique (LC-MS) du CRCHUM. Les échantillons biologiques utilisés à la génération des figures 8.3E, 8.5B et S8.2E ont également été préparé et envoyé à Génome Québec par DA. Enfin, DA s'est occupé de la préparation des échantillons biologiques utilisés à la génération des figures 8.1D-E-F, 8.3H et S8.2A-B-C-D et de la coordination avec EM pour l'analyse GC-MS qui en découle.

Chapitre 3 – CD73-A2a adenosine receptor axis promotes innate B cell antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccination

David Allard^{1,2,3}, Roxanne Charlebois^{1,3}, Loise Gilbert^{1,3}, John Stagg^{1,2,3*}, Pavel Chrobak^{1,3*}

*These authors contributed equally to this work

¹ Centre de Recherche du Centre Hospitalier l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

² Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Funding: This work was supported by the Famille Jean-Guy Sabourin Research Chair in Pharmacology of University of Montreal.

Competing interests: John Stagg is consultant, Scientific Advisory Board member and received Research grants from Surface Oncology. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

3.1 Résumé

Plusieurs personnes à risque d'infections à pneumocoque ne répondent que très peu au vaccin à polysaccharides Pneumovax 23. L'identification de voies thérapeutiques capable d'augmenter la réponse à la vaccination Pneumovax 23 est hautement pertinente. Nous avons étudié la contribution de la voie de signalisation adénoenergique régulée par l'ecto-nucléotidase CD73 dans la production d'anticorps en réponse au Pneumovax 23. À l'aide de souris génétiquement modifiées, nous avons démontré que l'absence de l'enzyme CD73 ou du récepteur à l'adénosine A2a retardait de façon significative la commutation isotypique de classe. Toutefois, les souris adultes génétiquement déficientes pour CD73 ou A2a ont fini par produire suffisamment d'anticorps spécifiques de type IgG3 et à contrôler l'infection à *S. pneumoniae* tel qu'observé dans les souris de type sauvage. En comparaison aux souris adultes, les jeunes souris de type sauvage ne sont pas parvenues à contrôler l'infection à *S. pneumoniae* après la vaccination, un phénomène associé à des niveaux réduits d'expression de CD73 sur les cellules B innées. Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle l'activation pharmacologique du récepteur A2a améliore l'efficacité d'immunisation du Pneumovax 23 dans les jeunes souris. Nous avons observé que l'administration d'un agoniste du récepteur A2a (CGS 21680) augmentait de façon significative la

production d'anticorps protecteurs de type IgG3 et la survie après une infection à *S. pneumoniae*. Notre étude suggère donc que l'activation pharmacologique du récepteur à l'adénosine A2a puisse améliorer l'efficacité de vaccination de Pneumovax 23 chez les populations à risque d'infections à pneumocoque.

3.2 Abstract

Many individuals at risk of streptococcal infection respond poorly to the pneumococcal polysaccharide vaccine Pneumovax 23. Identification of actionable pathways able to enhance Pneumovax responsiveness is highly relevant. We investigated the contribution of the extracellular adenosine pathway regulated by the ecto-nucleotidase CD73 in Pneumovax-induced antibody responses. Using gene-targeted mice, we demonstrated that CD73- or A2a adenosine receptor deficiency significantly delayed isotype switching. Nevertheless, CD73- or A2aR- deficient adult mice ultimately produced antigen-specific IgG3 and controlled *Streptococcus pneumoniae* infection as efficiently as wild type (WT) mice. Compared to adults, young WT mice failed to control *S. pneumoniae* infection after vaccination and this was associated with lower levels of CD73 on innate B cells. We hypothesized that pharmacological activation of A2a receptor may improve Pneumovax 23 immunization in young WT mice. Remarkably, administration of the A2a adenosine receptor agonist CGS 21680 significantly increased IgG3 responses and significantly enhanced survival after *S. pneumoniae* challenge. Our study thus suggests that pharmacological activation of the A2a adenosine receptor could improve the efficacy of Pneumovax 23 vaccination in individuals at risk of streptococcal infection.

3.3 Introduction

Infections with *S. pneumoniae* are a major cause of morbidity and mortality in infants under 2 years of age, elderly patients and immunocompromised individuals (1). Studies in mice demonstrated that antibodies produced by B-1a, B-1b and marginal zone (MZ) innate B cells play an important role in T cell-independent (TI) immune control of this pathogen both in naïve mice and in mice vaccinated with pneumococcal polysaccharides (2, 3). B-1a B cells contribute mostly by producing natural IgM Ab, while B-1b B cells and MZ B cells in addition to producing IgM can also isotype switch and produce IgG (mainly IgG3). While the role of human counterparts of B-1 B cells in anti-pneumococcal immunity still remains controversial (4, 5), several studies

concluded that human B-1 B cells indeed constitute a major B cell population responding to Pneumovax 23 vaccination (4, 6).

While pneumococcal polysaccharide vaccination is effective in preventing *S. pneumoniae* infections, individuals who are at the highest risk of infection respond poorly to the Pneumo- vax 23 vaccine. For instance, elderly patients have a decreased B-1 B cell pool (7) and young infants are incapable of generating protective antibodies, suggesting impairment of Pneumovax specific B cells in these populations (8). These observations stress the importance of identifying pathways and molecular targets which could be modulated therapeutically in order to enhance immune responses of these cells.

One of the important immune regulatory mechanism is through the production of extracellular adenosine by ecto-nucleotidases (9, 10). Extracellular adenosine acts as a negative regulator of innate and adaptive immune responses and of inflammation. It exerts many of its immunoregulatory effects through the A2a receptor (one of the four adenosine receptors) and modulates multiple aspects of immune responses, including immune cell effector and regulatory functions, and cell homing (11, 12). Therapeutic modulation of the adenosine pathway is an increasingly pursued avenue (9). One of the rate-limiting enzymes in the generation of extracellular adenosine is CD73, a GPI-anchored or soluble nucleotidase that catalyzes the dephosphorylation of AMP into adenosine. Whether CD73-generated adenosine is involved in regulation of B-1 innate B cell responses to *S. pneumoniae* infection is currently unknown.

On one hand, engaging the CD73-adenosine pathway might be able to suppress potentially harmful inflammatory host responses during pneumococcal bacterial pneumonia, as recently reported (13). On the other hand, CD73-derived adenosine may be required for effective antibody responses following vaccination. Accordingly, in vitro studies revealed that CD73 expression promotes class switch recombination in B-2 B cells (14). Furthermore, because CD73 expression in lymphocytes is developmentally regulated, CD73 levels on B cells are low in young infants and in patients with common variable immunodeficiency, two patient populations highly prone to *S. pneumoniae* infections (14, 15). The objective of this study was thus to investigate the importance of CD73 expression for innate B cell responses to *S. pneumoniae* following vaccination.

Murine B-1 B cells have been previously reported to express CD73 (16, 17). We tested the hypothesis that CD73 potentiates antibody effector responses of B-1 B cells and responsiveness to Pneumovax 23 vaccination. Using CD73-deficient and A2a-deficient knockout (KO) mice, we report that the CD73-A2a adenosine receptor axis enhances early IgM to IgG3 isotype switch responses in innate B cells in vivo, but is not critical for the control of *S. Pneumoniae* challenge following Pneumovax 23 vaccination in mice. Importantly, we also demonstrate that administration of an A2a adenosine receptor agonist in young mice is sufficient to enhance IgM to IgG3 isotype switch following Pneumovax 23 vaccination and improve the control of *S. pneumoniae* infection.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Mice

C57BL/6J WT mice were obtained from the Jackson Laboratory. C57BL/6N WT mice were maintained at the CRCHUM. CD73 KO (C57BL/6J background) and A2a KO (C57BL/6N) mice were obtained from Dr. Linda F. Thompson (Oklahoma Medical Research Foundation) and from Dr. Jiang-Fan Chen (Boston University School of Medicine) respectively and were maintained at the CRCHUM. Animals were housed in groups of 5 per cage. All experiments were approved by the Animal Protection Committee of the CRCHUM.

3.4.2 Antibodies and reagents

Pneumovax 23 (Merck) was obtained from CHUM pharmacy. PPS3 was obtained from ATCC. PC-BSA was obtained from Biosearch Technologies. Fluorochrome conjugated antibodies to rat anti-mouse CD19 (1D3), CD5 (53–7.3), CD23 (B3B4), CD73 (TY/11.8), CD43 (S7), CD21/35 (7G6), rat IgG1, κ isotype control unconjugated mouse CD16/32 (24G2), and rat IgG1, κ anti-mouse IgA (C10-3) were obtained from BD Biosciences. FITC-conjugated goat anti-rat IgG was obtained from eBioscience. CGS 21680 hydrochloride was obtained from Tocris Bioscience. *S. pneumoniae* strain WU-2 was a kind gift of Dr. David Briles (The University of Alabama at Birmingham). The bacteria were grown in Todd-Hewitt broth supplemented with 0.5% yeast extract and glycerol frozen stocks were kept at -80°C.

3.4.3 FACS

Single cell suspensions from spleen and peritoneal lavage (10^7 cells/mL) were pre-incubated with mouse Fc Block (unconjugated CD16/32) for 15 minutes and then stained with fluorochrome conjugated antibodies for 30 minutes at 4°C. Cells were analyzed using a BD FACS-Diva cytometer. Fluorescence minus one CD73 staining in CD73 KO mice or isotype control staining were used as negative controls.

3.4.4 Immunizations and *S. pneumoniae* infection

8 to 12-week-old and 3-week-old mice were considered adult and young mice respectively. Adult mice were immunized intraperitoneally (i.p.) with Pneumovax 23 (2.9 µg in 100 µl of PBS). Young mice were immunized i.p. with 10 µg of Pneumovax 23 (in 100 µL of DPBS). Mice treated with the selective A2a agonist CGS 21680 received daily dose of 1mg/kg diluted in DPBS, injected i.p. for four weeks. Young mice were weighed weekly and the dose was adjusted consequently. Serum for determining Ig by ELISA was obtained prior to and at different time-points after immunization. For pneumococcal infections, non-vaccinated, young vaccinated and adult vaccinated mice were injected four weeks after immunization with 10, 5×10^3 or 10^5 CFU *S. pneumoniae* respectively i.p. and survival was monitored for one week. Animals were monitored for the development of the following clinical signs (dehydration, eye discharge, abnormally rapid breathing, hunched back, hypoactivity (grade 1: normal activity; grade 2: slight hypoactivity; grade 3 significant hypoactivity; grade 4: failure to move), lack of righting reflex, and response to stimuli). Monitoring was done every 12 hours for the first 24 hours, and subsequently every 6 hours or, if clinical signs or greater than 10% body weight loss were observed, every 3 hours. Body weight was monitored every 12 hours during the first day and subsequently every 6 hours. In case of dehydration, animals were given 0.1 ml of saline solution sub-cutaneously and wet pieces of food pellets were put inside the cage. Animals that showed markedly depressed ability to move (grade 3 and 4), with or without lack of righting reflex or lack of response to stimuli or markedly altered breathing were immediately sacrificed. No animal death prior to reaching these clinical signs was observed, and no animals were found dead. Experiments were performed in an NC2 animal facility and all monitoring and manipulation of animals was done by NC2 trained personnel.

3.4.5 Enzyme-linked immunosorbent assays

ELISAs were performed according to a modified, previously published protocol (18). For antigen-specific antibodies, nunc maxisorp plates were either coated overnight with pneumococcal polysaccharide type 3 (PPS3) (10 µg/ml), or Phosphorylcholine (PC)-BSA (5 µg/mL). For immunoglobulin levels, plates were coated overnight with goat anti-mouse IgG (10 µg/ml) or goat anti-mouse IgM (10 µg/ml). Blocking was done for 2 hours (200 µL per well) at RT in PBS-0.1% Tween20-5% BSA. Samples were diluted in PBS-0.1% Tween20-0.1% BSA. For PPS3 ELISA, samples were preincubated for 60 minutes with CWPS (10 µg/ml). Samples were plated overnight at 50 µL per well. HRP-conjugated anti-mouse IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgA detection antibodies (1:2000 dilution; Southern Biotech, Birmingham, AL) were added for 2 hours at room temperature (50 µL per well), followed by tetramethylbenzidine (TMB) substrate (50 µL per well). Reaction was stopped after 15 minutes with 2N hydrochloric acid (HCl) (50 µL per well). Absorbance was read at 450 and corrected at 570 nm on a Versamax microplate reader. All steps were separated with washes (3X) made with PBS-0.1% Tween20. Samples were run in duplicates or triplicates. Analysis of ELISAs was done by determining OD (450–570). Each titer for a given mouse and ELISA was calculated as the inverse of the lowest dilution where OD readings are above 0.5 (at least 10-fold above background). Data from multiple experiments were analyzed by comparing the mean reciprocal titers of all mice included in WT, CD73 KO or A2a KO groups.

3.4.6 Immunofluorescence for gut IgA

Terminal ileum tissue was harvested from 8-week-old WT and CD73 KO mice, frozen in OCT media, sectioned on Superfrost Plus slides (Fisher; 12-550-15) and stored at -80°C. Slides were thawed at room temperature for 30 minutes, fixed in 4% PFA, washed in PBS, blocked in DAKO protein blocker for 1 hour and stained with anti-mouse IgA primary antibody for 2 hours at room temperature. Sections were then washed in PBS and incubated with the FITC-conjugated goat anti-rat IgG secondary antibody for 2 hours at room temperature. Slides were mounted with Prolong Gold plus DAPI (Invitrogen) and images were taken using a Nikon microscope with a X20 objective.

3.4.7 *Statistical Analysis*

Data are shown as means +/- SEM. Statistics are performed by unpaired Student's T test or one-way ANOVA with Bonferroni correction when multiple comparisons were made and survival curves were assessed by the log-rank test.

3.5 **Results**

3.5.1 *CD73 defines specific subsets of naïve and isotype-switched innate type B cells*

We first evaluated CD73 expression in adult mouse B cells. In agreement with previous studies (16), we observed high expression of CD73 on a subset of peritoneal B-1a (CD19+ CD5+ CD23-) and B-1b cells (CD19+ CD5- CD23-), splenic B-1a (CD19+ CD5+ CD43+) and marginal zone (MZ) (CD19+ CD21hi CD23low) B cells (**Fig 3.1A**). Consistent with a role for CD73 in isotype class-switching (14), the vast majority (~87%) of isotype-switched (IgG3+) B-1b B cells expressed CD73 (**Fig 3.1A**). In young mice (3-week-old), however, the majority of B-1a and B-1b B cells were negative for CD73 (**Fig 3.1B**), consistent with prior reports of low CD73 expression on B cells from young infants (15).

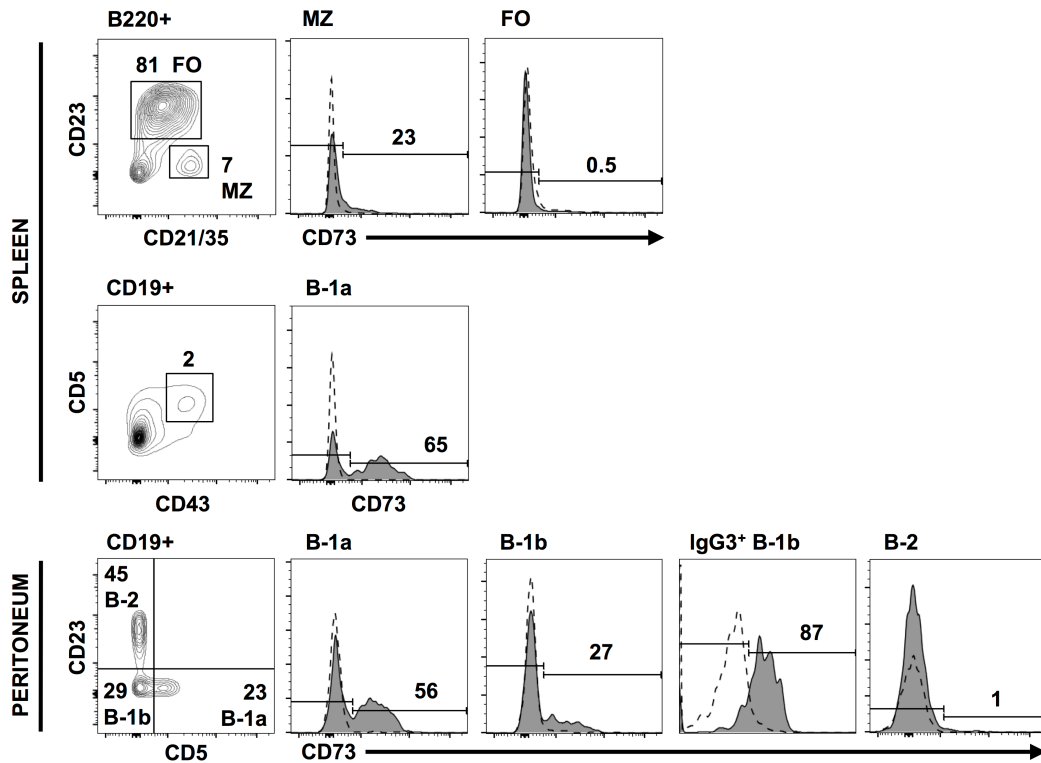
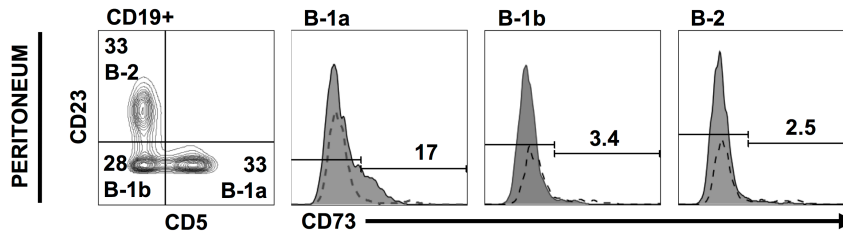
A.**B.**

Figure 3.1 – CD73 expression on B-1 B cells. (A) CD73 expression on distinct B cell subsets in adult 8 to 12-week-old mice (dashed lines show absence of staining in CD73 KO mice). (B) CD73 expression on B-1 B cells in young 3-week-old mice (dashed lines show isotype control). (FO: Follicular B cells, MZ: Marginal zone B cells).

3.5.2 Normal B cell development and steady state antibody levels in CD73 KO mice

We next compared the steady-state levels of the various B cell subsets in adult WT and CD73-deficient (KO) mice. We observed no statistical difference in absolute numbers of B-1 and B-2 cells (Table 3.1), supporting that CD73 is not required for their development. We next investigated the role of CD73 in innate B-1 B cell responses. B-1 B cells are the source of the natural antibody pool (e.g. anti-PC Ab targeting *S. pneumoniae* phosphorylcholine) (19), and in this way, contribute to a major portion of serum IgM. This natural antibody pool controls to some

extent *S. pneumoniae* bacteremia in unvaccinated mice (2). We measured total serum IgM and anti-PC natural IgM levels in WT and CD73 KO mice. As shown in **Fig 3.2A** and **2B**, no difference was observed between WT and CD73 KO mice. Because B-1 cells, especially the B-1b subset, have been shown to efficiently isotype switch to IgA-producing cells in vitro and in vivo (20, 21), we also compared gut-associated IgA levels, but observed no difference between WT and CD73 KO mice (**Panel A in Fig S3.1**). Consistent with these results, no difference in survival was observed in WT versus CD73 KO mice following low-dose *S. pneumoniae* challenge (**Fig 3.2C**). Taken together, our data strongly suggest preserved steady-state functions of B-1 B cells in CD73-deficient mice.

Table 3.1 – CD73 KO Mice Have Similar Numbers of Major B Cell Subsets.

Tissue	Phenotype	Absolute Cell number (x10 ⁶)		Percentage of CD73 ⁺
		WT	CD73KO	WT
Spleen	CD19 ⁺	37 ± 8	38 ± 9	
	FO (B220 ⁺ CD21 ⁺ CD23 ⁺)	25 ± 2	27 ± 3	1.0 ± 0.4
	MZ (B220 ⁺ CD21 ⁺ CD23 ⁺)	4.2 ± 0.2	4.7 ± 1.8	24.0 ± 0.3
	B-1a (CD19 ⁺ CD43 ⁺ CD5 ⁺)	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	65 ± 4
Peritoneal Cavity	B-2 (CD19 ⁺ CD23 ⁺ CD5 ⁺)	0.60 ± 0.16	0.45 ± 0.17	6 ± 1
	B-1a (CD19 ⁺ CD23 ⁺ CD5 ⁺)	0.35 ± 0.30	0.30 ± 0.10	53 ± 1
	B-1b (CD19 ⁺ CD23 ⁺ CD5 ⁺)	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.07	24 ± 8

Peritoneal cells and splenocytes from 8 to 12-week-old WT and CD73 KO mice were analyzed by Flow Cytometry for the presence of indicated B cell subsets. Cell numbers were obtained by obtaining absolute cell count as well as cell percentages. At least five mice of each genotype were analyzed. (FO: Follicular B cells, MZ: Marginal zone B cells).

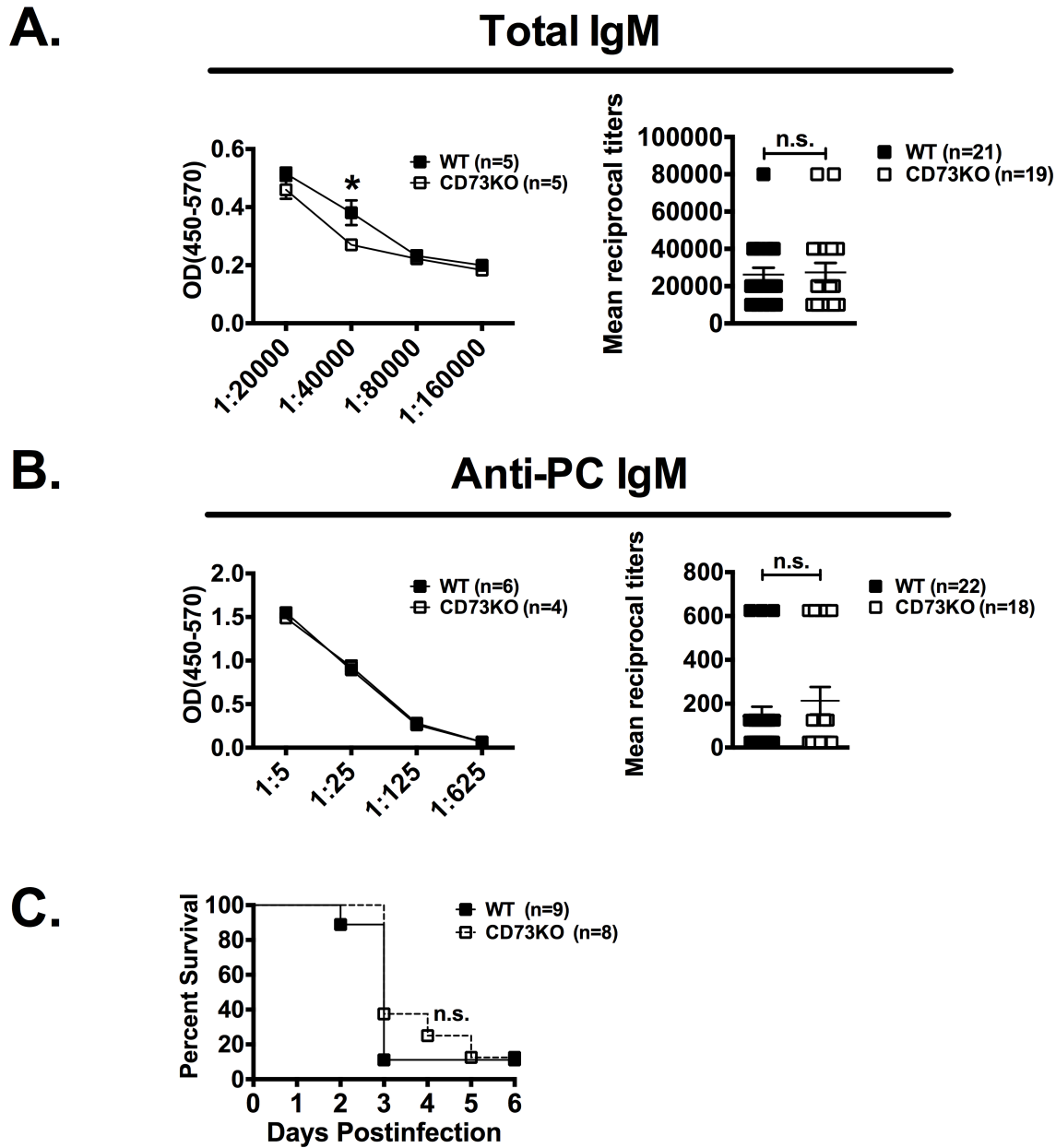


Figure 3.2 – Preserved steady-state functions of B-1 B cells in CD73-deficient mice. (A) Total serum IgM levels were measured in adult WT and CD73 KO mice (8 to 12-week-old). Titration curves of one experiment are shown (means \pm standard errors; *: $p < 0.05$ by Student's T test). Bar graphs were generated from three independent experiments (mean reciprocal titers \pm standard errors are shown; n.s.: not significant; by Student T test). (B) Serum anti-phosphorylcholine (PC) IgM levels were measured in adult WT and CD73 KO mice (8 to 12-week-old). Titration curves of one experiment are shown. Bar graph were generated from three independent experiments (mean reciprocal titers \pm standard errors are shown; n.s.: not significant; by Student T test). (C) Naïve adult WT and CD73 KO mice (8 to 12-week-old) were injected i.p. with 10 CFU of *S. pneumoniae* and survival monitored over time (n.s.: $p > 0.05$ by log-rank test).

3.5.3 Delayed IgM to IgG3 isotype switching but comparable susceptibility to *S. pneumoniae* challenge in CD73 KO mice following Pneumovax 23 vaccination

Induced T cell independent IgG (especially IgG3 in mice) and IgM produced by innate B cells play an important role in the immune control of *S. Pneumoniae* (2, 18). We therefore compared IgG3 and IgM production following Pneumovax 23 vaccination in WT and CD73 KO mice. We also compared the ability of vaccinated WT and CD73 KO mice to control *S. pneumoniae* infection. Antibody responses were measured against PPS3, a major component of the *S. pneumoniae* strain WU2 capsule (22) that is included in the Pneumovax 23 vaccine. As shown in **Fig 3.3**, vaccination of adult CD73 KO mice with Pneumovax 23 induced a slightly higher PPS3-specific IgM response and a lower IgG3 response compared to WT mice in the first week following vaccination. The anti-PPS3 IgG3 response however normalized at later time-points (**Fig 3.3A and 3.3B**). These data thus indicated a delayed, yet effective, IgM to IgG3 isotype switching in CD73-deficient mice vaccinated with Pneumovax 23. To assess if this delay in isotype switching was associated to a decreased protective response, we challenged vaccinated mice with a lethal high-dose of *S. pneumoniae*. As shown in **Fig 3.3C**, survival rates in adult WT and CD73 KO mice were similar following challenge (**Fig 3.3C**). Our data thus demonstrated that CD73 was not required for protective innate B cell antibody responses against *S. pneumoniae*.

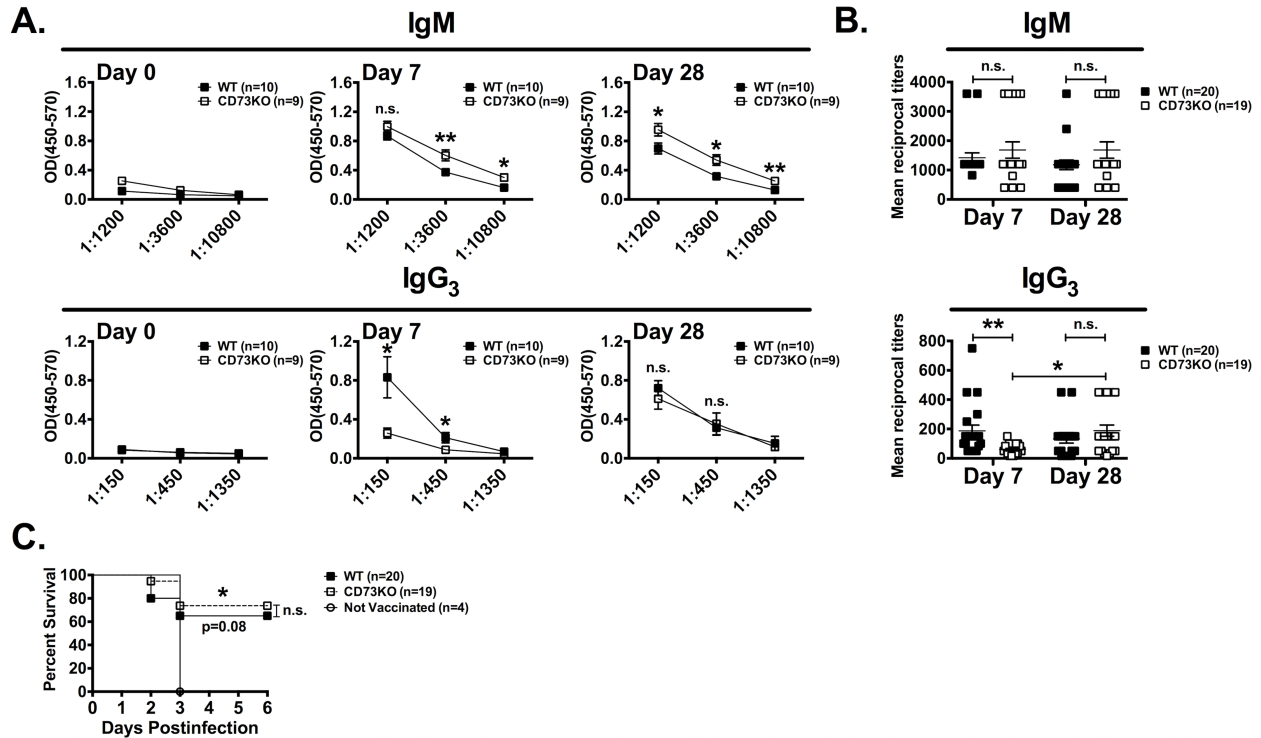


Figure 3.3 – CD73-deficiency is associated with delayed IgG3 response after Pneumovax 23 vaccination. 8 to 12-week-old WT and CD73 KO mice were immunized i.p. with Pneumovax 23 and sera were analyzed by ELISA for anti-PPS3 specific Abs at day 0, 7 and 28 after vaccination. On day 28, mice were challenged by i.p. injection of *S. pneumoniae* (10^5 CFU). (A) Anti-PPS3 IgM and IgG3 OD (450–570) readings are shown (means \pm standard errors are shown; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ by Student's T test). (B) Combined results from 2 experiments pooling 20 WT and 19 CD73 KO mice showing IgM and IgG3 mean reciprocal titers at day 7 and 28 (means \pm standard errors are shown; **: $p < 0.01$; by One-way ANOVA; brackets are shown when significantly different from day 7 and 28 for a given group). (C) Survival of infected mice was monitored (*: $p < 0.05$ by log-rank test; survival was compared to non-vaccinated mice, unless indicated by brackets; n.s.: not significant).

3.5.4 IgG3 delay following Pneumovax 23 vaccination in A2aR KO mice

In order to test if the delay in Pneumovax induced IgG3 production in CD73 KO mice is a consequence of abrogated adenosine receptor engagement, we tested Pneumovax 23 antibody response in A2aR-deficient mice. The A2a receptor is ubiquitously expressed, and many biologic effects of adenosine, including the effect of adenosine on isotype switching during T cell dependent B cell responses (23, 24) are mediated via this receptor. A2aR-deficient mice show preserved frequencies and numbers of innate B-1 B cells (**Fig S3.2**). Following Pneumovax 23 vaccination of A2aR KO mice we observed normal kinetics of PPS3 specific serum IgM but a delay of PPS3 specific IgG3 (**Fig 3.4A and 3.4B**). To rule out the possibility that the IgG3 response is simply skewed toward another IgG isotype, we measured PPS3 specific IgG1, IgG2a and IgG2b, but did not detect any increase of these isotypes. In addition, PPS3 specific IgA levels were

similarly increased in serum of vaccinated A2aR KO mice (**Fig S3.3**). Similar to CD73 KO mice, PPS3 specific IgG3 serum levels were normal by 4 weeks, and A2aR-deficient mice were protected against a lethal live *S. pneumoniae* challenge (**Fig 3.4C**). These results suggest that the delay of IgG3 production in CD73 KO mice is a consequence of impaired A2a receptor engagement and show that A2a receptor is also not required for Pneumovax 23 induced protective innate B cell responses.

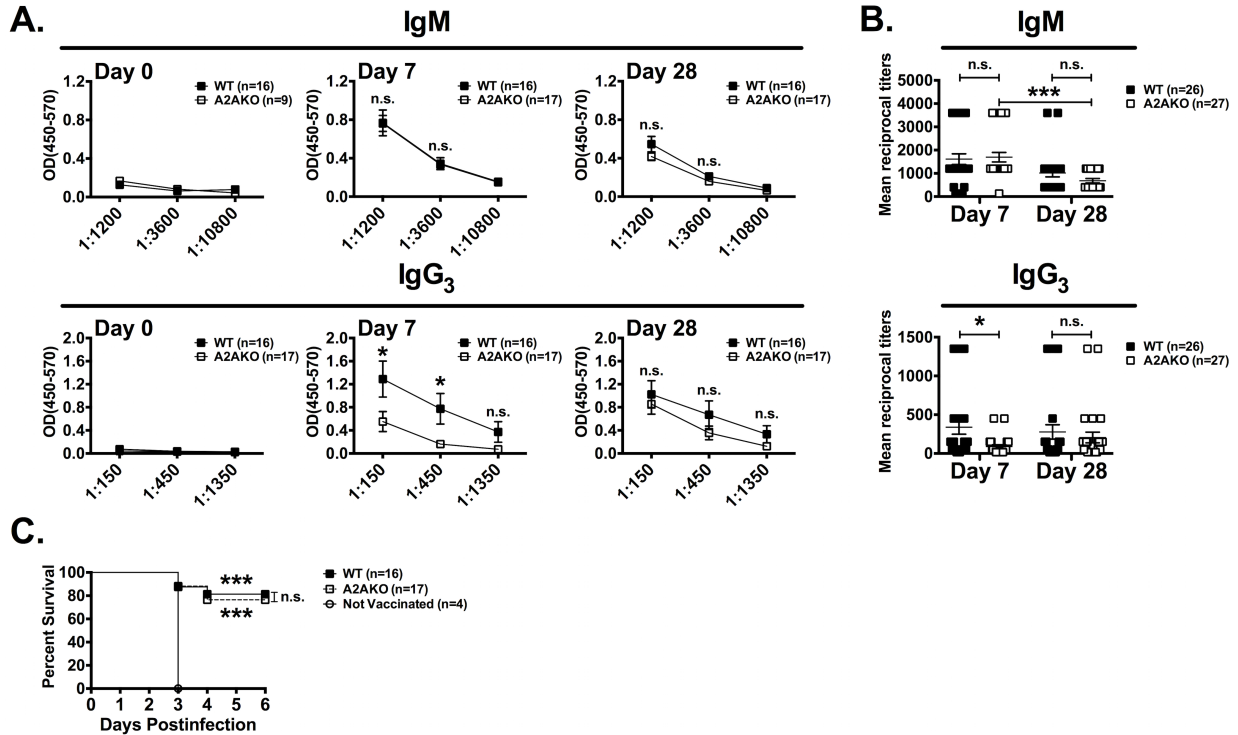


Figure 3.4 – A2aR-deficiency is associated with delayed IgG3 response after Pneumovax 23 vaccination. 8 to 12-week-old WT and A2a KO mice were immunized i.p. with Pneumovax 23 and sera were analyzed by ELISA for anti-PPS3 specific Abs on days 0, 7 and 28 after vaccination. On day 28, mice were challenged by i.p. injection of *S. pneumoniae* (10^5 CFU). (A) Anti-PPS3 IgM and IgG3 OD (450–570) readings are shown (means \pm standard errors are shown; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ by Student's T test). (B) Combined results from 2 experiments pooling 26 WT and 27 A2a KO mice showing IgM and IgG3 mean reciprocal titers at day 7 and 28 (means \pm standard errors are shown; *: $p < 0.05$; by One-way ANOVA; brackets are shown when significantly different from day 7 and 28 for a given group). (C) Survival of infected mice was monitored (*: $p < 0.05$ by log-rank test; survival was compared to non-vaccinated mice, unless indicated by a bracket; n.s.: not significant).

3.5.5 Administration of an A2a agonist enhances anti-PPS3 IgG3 Ab response in Pneumovax 23 vaccinated young mice and improves survival following *S. pneumoniae* challenge

Children under 2 years of age and young mice respond poorly to Pneumovax 23 vaccination (25). Based on our observation that CD73 is poorly expressed on B-1 B cells in young mice and that CD73 and the A2aR promote isotype switching, we hypothesized that pharmacological

agonists of the A2aR receptors may enhance the protective effects of Pneumovax 23 in this population. We thus investigated whether administration of an A2a adenosine receptor agonist (CGS 21680) could enhance antibody responses following Pneumovax 23 vaccination in young mice. As shown in **Fig 3.5A and 5B**, treatment with the A2a agonist significantly increased mean IgG3 levels at day 7 and 14 post-vaccination (**Fig 3.5A and 3.5B**). Notably, this increase in IgG3 titers, although still lower than in vaccinated adult mice (**Figs 3.5B and 3.3B and 3.4B**) reflected a higher percentage of mice that responded to the vaccine (i.e. 6/10 mice in the CGS-treated group compared to 3/10 in the control group on day 28; **Fig 3.5B**). We next challenged the vaccinated mice with a lethal high-dose of *S. pneumoniae*. Consistent with prior studies (23, 25), vaccination of young WT mice with Pneumovax 23 failed to significantly protect them from *S. pneumoniae* infection. In contrast, co-administration of Pneumovax 23 and the A2a receptor agonist significantly increased survival of young mice compared to non-vaccinated mice (**Fig 3.5C**). Our study thus demonstrated that pharmacological activation of A2a adenosine receptor signaling is an effective means to promote class-switch recombination and enhance the protective effects of pneumococcal polysaccharide vaccination in young mice.

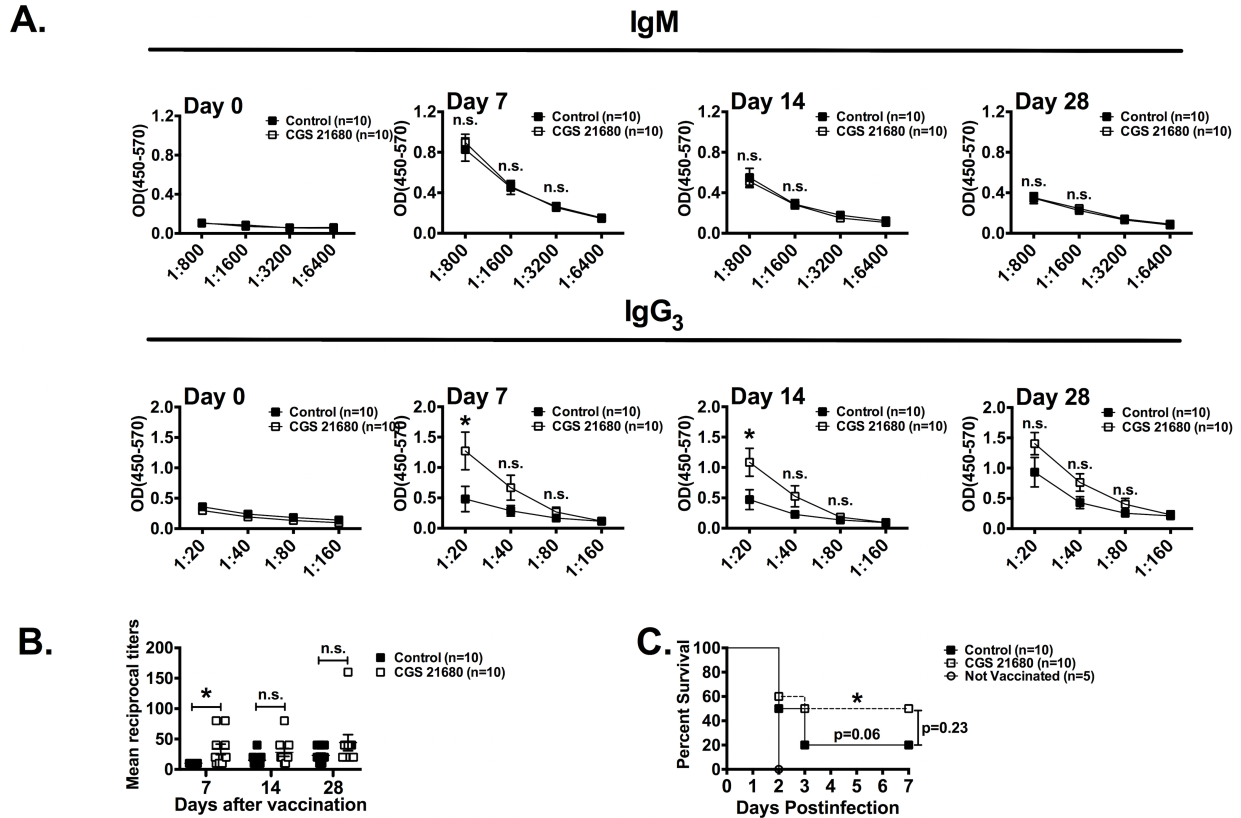


Figure 3.5 – A2a receptor agonist enhances Pneumovax 23 responses in young mice. Young (3-week-old) WT mice were immunized i.p. with 10 μ g of Pneumovax 23 and were subsequently treated daily with CGS 21680 or vehicle only DMSO (control) for 4 weeks as described in methods. Sera were analyzed by ELISA for anti-PPS3 specific Abs at day 0, 7, 14 and 28 after vaccination. On day 28, mice were challenged by i.p. injection of *S. pneumoniae* (5×10^3 CFU). (A) Anti-PPS3 IgM and IgG3 OD (450–570) readings are shown (means \pm standard errors are shown; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ by Student's T test). (B) IgG3 mean reciprocal titers at day 7, 24 and 28 showing individual mice (means \pm standard errors are shown; *: $p < 0.05$; by One-way ANOVA). (C) Survival of infected mice (*: $p < 0.05$ by log-rank test; n.s.: $p > 0.05$; survival was compared to non-vaccinated mice unless indicated by a bracket).

3.6 Discussion

We here addressed the role of the adenosine-generating ecto-enzyme CD73 on innate B cell responses during streptococcal infections. Consistent with prior in vitro work that revealed a role for CD73 in class-switch recombination (14), we demonstrated that CD73 promoted IgM to IgG3 isotype switching in mice vaccinated with Pneumovax 23. However, while CD73 expression accelerated IgG3 responses, CD73-deficient mice eventually mounted similar levels of antigen-specific IgG3 as WT mice. Hence, CD73 is not required for in vivo isotype switching, at least in response to Pneumovax 23. Our data further support correlative observations previously made in humans, where functionally compromised neonatal B cells were shown to lack CD73 expression (15) and adult isotype-switched B cells were shown to be enriched for CD73+ cells (14).

Our observations using A2a-deficient KO mice suggest that the contribution of CD73 toward IgG3 production occurred through its enzymatic activity and through the engagement of the A2a receptor. Our data also indicate that delayed IgG3 production is not a consequence of skewing of IgG3 Ab response towards other IgG isotypes and that Pneumovax induced IgA production is not compromised.

The biologic basis of the isotype switch delay observed in CD73-deficient mice warrants further investigation. IgM to IgG3 class switch recombination is induced by synergistic BCR and TLR signaling (26), but is also modulated by cytokines, such as IL-21 (27), at least in human B cells. Interestingly, IL-21 is known to upregulate CD73 on B and T cells (14). Adenosine generated by CD73 has been shown to modulate cytokine production in macrophages (28). It is possible that altered cytokine production lies at the heart of the isotype switch delay in CD73-deficient mice. Alternatively, since CD73 is known to be involved in the regulation of lymphocyte homing (29), the lack of extracellular CD73-generated adenosine could also impact the homing of B-1 B cells to the spleen, which is a component of an efficient antibody response (3). Proper homing of B cells to the marginal zone is regulated by the chemokines and chemokine receptors. Interestingly, adenosine has been proposed to modulate the CXCL12/CXCR4 axis (30) which may be relevant since B cell deficiency of CXCR4 leads to a decreased size of the marginal zone (29) as well as decreased TI antibody responses (31). Alternatively, the CD73/A2a axis could regulate the rate of expansion of isotype switched B cells. Preliminary experiments assessing in vitro B-1 B cell IgG3 Ab production failed to show a difference between WT and CD73KO mice, suggesting an abnormal in-vivo niche for IgG3 producing cells in CD73KO mice.

The observation that we could increase Pneumovax 23-induced IgG3 levels and improve protection against *S. pneumoniae* challenge by administering an A2a receptor agonist, suggests that modulation of the extracellular adenosine pathway is a potential avenue for increasing responsiveness to Pneumovax 23 in vulnerable populations, such as young infants and elderly. B cells in very young individuals show several deficiencies and are functionally compromised. B cells from newborns have very low levels of CD73 and low levels of the transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI; receptor for BAFF and APRIL),

which plays a key role in efficient antibody responses against polysaccharide vaccines (32). Interestingly, recent studies demonstrated that A2a adenosine receptor negatively regulated isotype switched IgG1 germinal center (GC) responses (23), likely via the suppression of T follicular helper cell differentiation (23, 24). The impact of A2a receptor agonist treatment on antibody responses may thus vary depending on the cells that are targeted and mechanisms of B cell activation.

The introduction of pneumococcal conjugate vaccines (PCVs) has significantly reduced the incidence of invasive pneumococcal disease caused by vaccine included serotypes (33), particularly in children. However, strains not included in the PCV vaccines still cause considerable disease, especially in susceptible populations. Therefore, administration of Pneumovax 23, which has a wider serotype coverage, is recommended in children and adults with conditions that put them at an increased risk of disease and in adults 65 years or older. For these individuals, optimization of anti-Pneumovax 23 vaccine response still remains a priority. The effect of CD73/A2a pathway modulation in the context of PCV however needs to be carefully assessed, as A2a agonist rather than antagonist has been described to suppress T cell dependent germinal center reactions (23). Timing of PCV and Pneumovax 23 administration and of any adenosinergic pathway modulation may be critical. In conclusion, our study clarified the role of CD73 and the A2a adenosine receptor on innate B cell isotype-switching and identified A2a adenosine receptor as a potential target to enhance the protective activity of Pneumovax 23 against *S. pneumoniae* infections. Therapeutic targeting of A2a receptor could be attempted in combination with the targeting of additional pathways already known to modulate anti-Pneumovax 23 responses, such as PD-1 (22), TLR (34), or IL-7/IL7-R (25).

3.7 Acknowledgments

We are grateful to Dr. Johanne Poudrier for helpful suggestions and for reading the manuscript.

3.8 References

1. Ash SY, Sheffield JV. Pneumococcus. *Med Clin North Am.* 2013; 97(4):647–666, x–xi. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.03.005> 23809718
2. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity.* 2005; 23(1):7–18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.011> 16039575
3. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity.* 2001; 14(5):617–629. 11371363
4. Leggat DJ, Khaskhely NM, Iyer AS, Mosakowski J, Thompson RS, Weinandy JD, et al. Pneumococcal polysaccharide vaccination induces polysaccharide-specific B cells in adult peripheral blood expressing CD19(+)CD20(+)CD3(-)CD70(-)CD27(+)IgM(+)CD43(+)CD5(+)(-). *Vaccine.* 2013; 31(41):4632–4640. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.030> 23911852
5. Roth A, Glaesener S, Schutz K, Meyer-Bahlburg A. Reduced Number of Transitional and Naive B Cells in Addition to Decreased BAFF Levels in Response to the T Cell Independent Immunogen Pneumovax (R)23. *PLoS One.* 2016; 11(3):e0152215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152215> 27031098
6. Rothstein TL, Quach TD. The human counterpart of mouse B-1 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1362:143–152. <https://doi.org/10.1111/nyas.12790> 25988790
7. Rothstein TL. Natural Antibodies as Rheostats for Susceptibility to Chronic Diseases in the Aged. *Front Immunol.* 2016; 7:127. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00127> 27092140
8. Daniels CC, Rogers PD, Shelton CM. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2016; 21(1):27–35. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-21.1.27> 26997927
9. Allard B, Beavis PA, Darcy PK, Stagg J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2016; 29:7–16. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.04.001> 27209048
10. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013; 19(6):355–367. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005> 23601906
11. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev.* 2017; 276(1):121–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12528> 28258700
12. Vijayan D, Young A, Teng MWL, Smyth MJ. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017; 17(12):709–724. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86> 29059149
13. Bou Ghanem EN, Clark S, Roggensack SE, McIver SR, Alcaide P, Haydon PG, et al. Extracellular Adenosine Protects against *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. *PLoS Pathog.* 2015; 11(8):e1005126. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005126> 26313746
14. Schena F, Volpi S, Faliti CE, Penco F, Santi S, Proietti M, et al. Dependence of immunoglobulin class switch recombination in B cells on vesicular release of ATP and CD73 ectonucleotidase activity. *Cell Rep.* 2013; 3(6):1824–1831. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.022> 23770243
15. Pettengill MA, Levy O. Circulating Human Neonatal Naive B Cells are Deficient in CD73 Impairing Purine Salvage. *Front Immunol.* 2016; 7:121. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00121> 27066009
16. Kaku H, Cheng KF, Al-Abed Y, Rothstein TL. A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J Immunol.* 2014; 193(12):5904–5913. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400336> 25392527
17. Almishri W, Deans J, Swain MG. Rapid activation and hepatic recruitment of innate-like regulatory B cells after invariant NKT cell stimulation in mice. *J Hepatol.* 2015; 63(4):943–951. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.007> 26095178
18. Haas KM, Blevins MW, High KP, Pang B, Swords WE, Yammani RD. Aging promotes B-1b cell responses to native, but not protein-conjugated, pneumococcal polysaccharides: implications for vaccine protection in older adults. *J Infect Dis.* 2014; 209(1):87–97. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit442> 23964109
19. Savage HP, Baumgarth N. Characteristics of natural antibody-secreting cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1362:132–142. <https://doi.org/10.1111/nyas.12799> 26104151
20. Roy B, Shukla S, Lyszkiewicz M, Krey M, Viegas N, Duber S, et al. Somatic hypermutation in peritoneal B1b cells. *Mol Immunol.* 2009; 46(8–9):1613–1619. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.02.026> 19327839
21. Roy B, Brennecke AM, Agarwal S, Krey M, Duber S, Weiss S. An intrinsic propensity of murine peritoneal B1b cells to switch to IgA in presence of TGF-beta and retinoic acid. *PLoS One.* 2013; 8(12): e82121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082121> 24324757

22. McKay JT, Egan RP, Yammani RD, Chen L, Shin T, Yagita H, et al. PD-1 suppresses protective immunity to *Streptococcus pneumoniae* through a B cell-intrinsic mechanism. *J Immunol.* 2015; 194 (5):2289–2299. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401673> 25624454
23. Abbott RK, Silva M, Labuda J, Thayer M, Cain DW, Philbrook P, et al. The GS Protein-coupled A2a Adenosine Receptor Controls T Cell Help in the Germinal Center. *J Biol Chem.* 2017; 292(4):1211– 1217. <https://doi.org/10.1074/jbc.C116.764043> 27974461
24. Schmiel SE, Yang JA, Jenkins MK, Mueller DL. Cutting Edge: Adenosine A2a Receptor Signals Inhibit Germinal Center T Follicular Helper Cell Differentiation during the Primary Response to Vaccination. *J Immunol.* 2017; 198(2):623–628. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601686> 27986907
25. Shriner AK, Liu H, Sun G, Guimond M, Alugupalli KR. IL-7-dependent B lymphocytes are essential for the anti-polysaccharide response and protective immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 2010; 185(1):525–531. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902841> 20505146
26. Pone EJ, Zhang J, Mai T, White CA, Li G, Sakakura JK, et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-kappaB pathway. *Nat Commun.* 2012; 3:767. <https://doi.org/10.1038/ncomms1769> 22473011
27. Pene J, Gauchat JF, Lecart S, Drouet E, Guglielmi P, Boulay V, et al. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J Immunol.* 2004; 172(9):5154–5157. 15100251
28. Hamidzadeh K, Mosser DM. Purinergic Signaling to Terminate TLR Responses in Macrophages. *Front Immunol.* 2016; 7:74. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00074> 26973651
29. Salmi M, Jalkanen S. Homing-associated molecules CD73 and VAP-1 as targets to prevent harmful inflammations and cancer spread. *FEBS Lett.* 2011; 585(11):1543–1550. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.033> 21515268
30. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, et al. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood.* 2011; 118(23):6141–6152. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374728> 21998208
31. Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med.* 2004; 200(9):1145–1156. <https://doi.org/10.1084/jem.20041185> 15520246
32. Kanswal S, Katsenelson N, Selvapandiyam A, Bram RJ, Akkoyunlu M. Deficient TACI expression on B lymphocytes of newborn mice leads to defective Ig secretion in response to BAFF or APRIL. *J Immunol.* 2008; 181(2):976–990. 18606649
33. Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017; 12(5):e0177113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177113> 28486544
34. Taillardet M, Haffar G, Mondiere P, Asensio MJ, Pleau-Pison T, Burdin N, et al. Toll-like receptor agonists allow generation of long-lasting antipneumococcal humoral immunity in response to a plain polysaccharidic vaccine. *J Infect Dis.* 2010; 202(3):470–479. <https://doi.org/10.1086/653739> 20575660

3.9 Supplementary figures

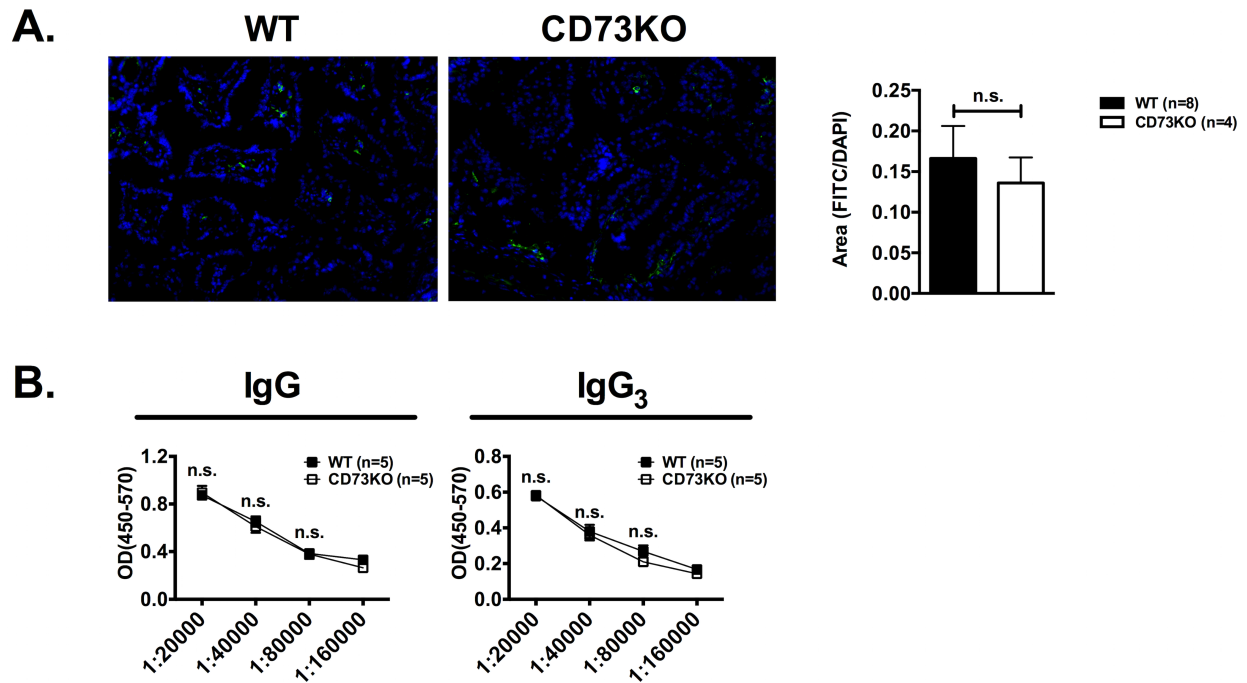


Figure S3.1 – CD73 KO mice have normal Ig levels. 8 to 12-week-old WT and CD73 KO mice were assessed for Ig levels. (A) Detection of IgA-secreting cells in the gut by immunohistochemistry. Area of anti-IgA FITC staining was normalized to DAPI. Data were generated from 40 fields from WT and 20 fields from CD73 KO mice. (B) Serum IgG and IgG₃ levels were determined by ELISA. (n.s.: $p > 0.05$, unpaired Student's T test; means \pm standard errors are shown).

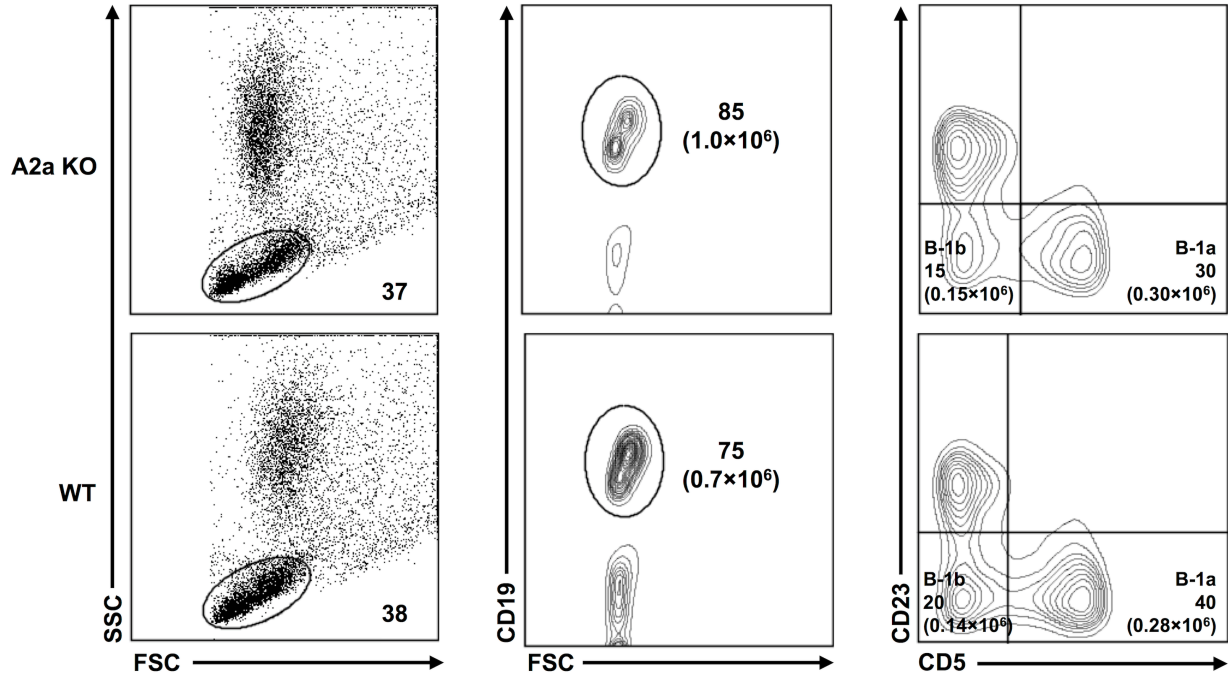


Figure S3.2 – A2a-deficient KO mice have preserved Peritoneal B-1 B cell populations. Peritoneal cells were pooled from 14 WT and 12 A2a KO mice, and were analyzed by FACS for B-1 B cell populations. Numbers represent percentages and cell numbers (in parentheses, expressed as cells per mouse).

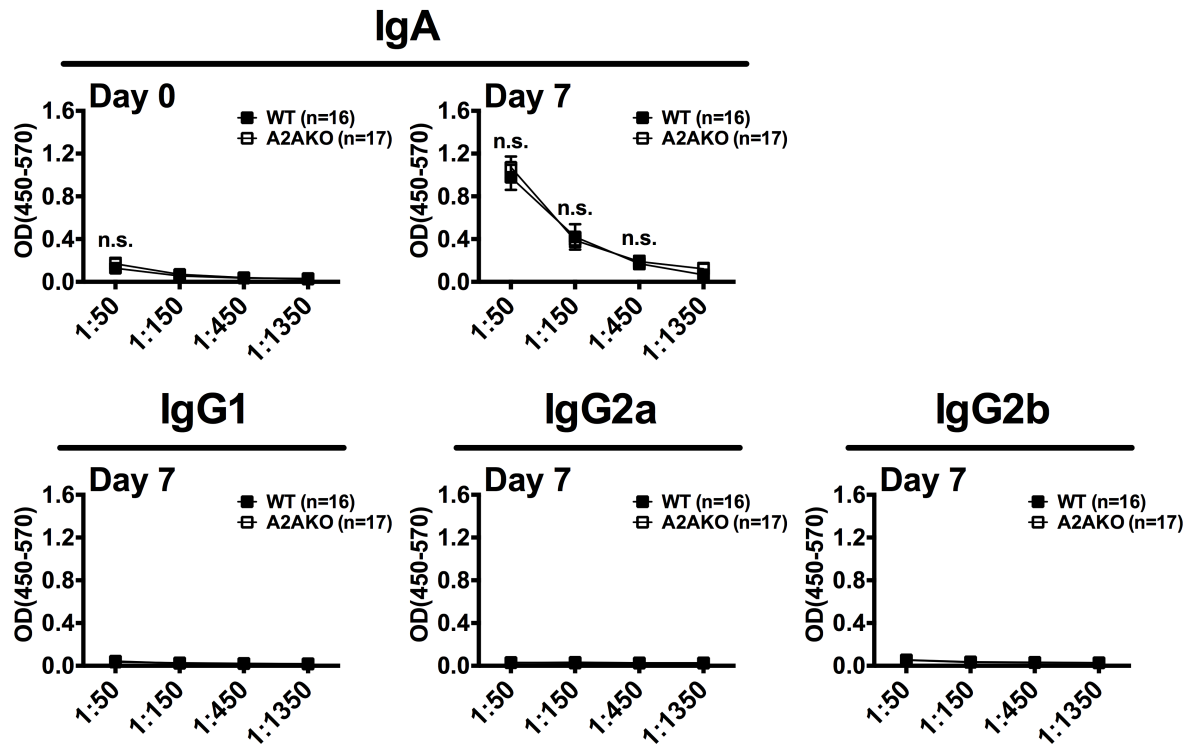


Figure S3.3 – A2a KO vaccinated mice have normal PPS3 specific IgA levels. 16 and 17, 8 to 12-week-old, WT and A2a KO mice respectively were assessed for PPS3 specific IgA, IgG1, IgG2a and IgG2b levels 1 week after Pneumovax immunization. Serum levels were determined by ELISA. (n.s.: $p > 0.05$, unpaired Student's T test; means \pm standard errors are shown).

3.10 Résultats connexes non publiés

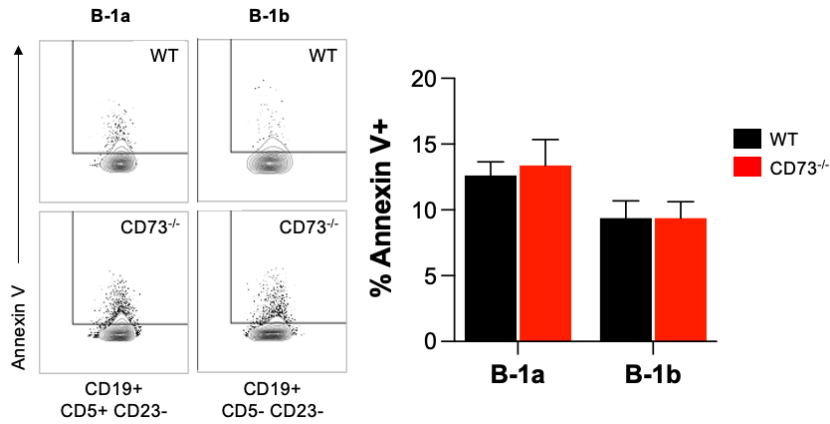


Figure C3.1 – L’expression de CD73 n’influence pas la survie des lymphocytes B-1 murins.

Pourcentages de cellules apoptotiques (annexin V+) évalués par FACS sur des populations de lymphocytes B du péritoine de souris WT et CD73^{-/-} activés *in vitro* par stimulation du BCR via la conjugaison de fragment F(ab) avec des billes de streptavidine tel que décrit dans la littérature (811).

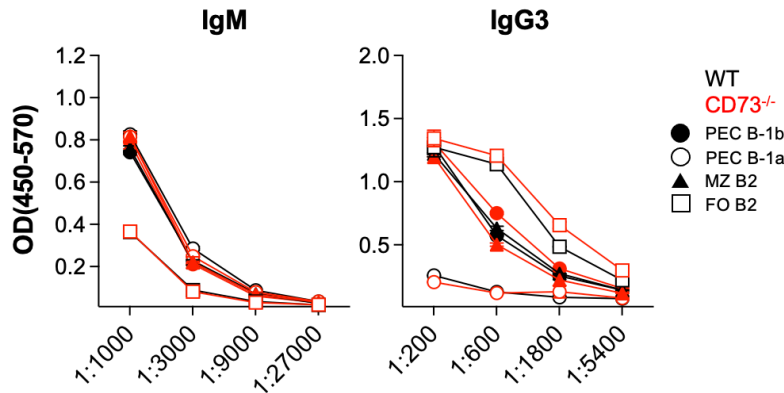


Figure C3.2 – L’expression de CD73 n’influence pas la commutation de classe isotypique *in vitro*.

Mesure d’anticorps de classes IgM et IgG3 en réponse à la stimulation *in vitro* par le LPS (2 µg/mL), après 7 jours, des lymphocytes B-1a (CD19+CD5+CD23-) et B-1b (CD19+CD5-CD23-) du péritoine (PEC) ainsi que des lymphocytes B2 de la rate (MZ; zone marginale, CD19+CD23-CD21+. FO; folliculaires CD19+ CD23+ CD21+) isolées par triage cellulaire de souris WT et CD73^{-/-}.

Chapitre 4 – CD73 promotes chronic lymphocytic leukemia in mice

David Allard^{1,2,3}, Pavel Chrobak^{1,3}, Priscilla Tessier^{1,3}, Marjorie A. Bergeron^{1,2,3}, Nathalie Johnson⁴ and John Stagg^{1,2,3}

¹ Centre de Recherche du Centre Hospitalier l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

² Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁴ Department of Medicine, Jewish General Hospital, Montréal, Québec, Canada

Funding: This work was supported by the Leukemia and Lymphoma Society of Canada.

Competing interests: John Stagg is consultant, Scientific Advisory Board member and received Research grants from Surface Oncology.

4.1 Résumé

CD73, l'enzyme responsable de la production d'adénosine (ADO) extracellulaire, joue un rôle important dans l'immunité antitumorale. ADO exerce une activité immunosuppressive principalement via l'activation du récepteur à l'adénosine A2a exprimé sur les cellules immunitaires. Alors que le rôle de CD73 et A2a dans l'échappement à la surveillance immunitaire dans des contextes de tumeurs solides est bien établi, peu d'études se sont intéressées au rôle de CD73 dans les cancers hématologiques. En utilisant un modèle de souris transgénique (E μ -TCL1) de leucémie lymphoïde chronique (LLC), nous avons démontré que l'axe CD73-adénosine est modulé positivement avec la progression de la maladie. Étonnamment, nous avons observé que seules les souris mâles E μ -TCL1 déficientes pour CD73 présentent un meilleur contrôle immunitaire antitumoral et une survie augmentée dépendante de l'IFN γ en comparaison aux souris leucémiques qui de type sauvage pour CD73. De façon intrigante, nous avons observé que l'ablation chirurgicale des gonades n'affectait pas la survie des souris mâles ni femelles E μ -TCL1 déficientes pour CD73. Finalement, nous avons observé que l'expression de CD73 sur les cellules leucémiques de LLC humaine au moment du diagnostic était associé à un mauvais pronostic. En conclusion, notre étude supporte l'étude l'axe CD73-A2a dans la LLC et identifie un rôle précédemment inconnu de CD73 qui favorise la LLC selon le sexe.

4.2 Abstract

The extracellular adenosine (ADO)-generating enzyme CD73 is an important immune checkpoint in tumor immunity. ADO exerts immunosuppression essentially via the A2a adenosine receptor expressed on immune cells. While the role of CD73 and A2a in immune evasion of solid cancers is well established, few studies have investigated the role of CD73 in blood cancers. Using the E μ -TCL1 transgenic mouse model of chronic lymphocytic leukemia (CLL), we demonstrated that the CD73-adenosinergic axis is upregulated upon disease progression. Unexpectedly, we observed a sex bias, whereby CD73-deficient E μ -TCL1 transgenic male mice, but not female mice, displayed significantly enhanced tumor immune control and better survival compared to CD73-proficient E μ -TCL1 male mice. Mechanistic studies revealed a critical role for IFN- γ in the enhanced tumor control observed in CD73-deficient male mice. Interestingly, gonadectomized CD73-deficient mice displayed no significant differences in survival compared to their respective non-gonadectomized controls, suggesting that CD73 promoted CLL in a hormone-independent manner. Finally, we observed that CD73 expression levels on human leukemic CLL cells at diagnosis was significantly associated with worse prognosis. In conclusion, our study supports further investigation of the CD73-A2a axis in CLL and uncovers a previously unknown pro-leukemic role for CD73 according to sex.

4.3 Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common type of leukemia in the western world and affect mainly the elderly with almost twice as much male than female patients diagnosed (1, 2). CLL is characterized by the clonal expansion of mature CD5-expressing B cells in blood, spleen, lymph nodes and bone marrow (3). The clinical course is highly variable and spans on several years. While no specific disease driver was identified, several genetic alterations such as TP53 and IGVH mutational status were reported to help risk stratification and therapeutic management (4). Anti-CD20 monoclonal antibodies (i.e., rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, ublituximab) has greatly revolutionized treatment of CLL but has limited efficacy when used in monotherapy due to acquired resistance mechanisms including downregulation of CD20 by leukemic cells (5-7). Given the large amount of evidence supporting a role for BCR signaling in CLL progression, the addition of a Bruton tyrosine kinase inhibitor (Ibrutinib) has also greatly and positively impacted the therapeutic management of CLL (8). Thus, depending on the fitness of the

patient, nowadays treatment will often include a combination of at least one targeted therapy and traditional chemotherapeutics (i.e., fludarabine and chlorambucil) (4). However, a recent study showed that ibrutinib induces weight gain (9) which could raise concerns over treatment management since about 1 patient out of 4 dies from CLL-unrelated co-morbidities (10). Overall, CLL disease course remains mostly unpredictable, is largely incurable and bears poor prognosis upon relapse or when patients become refractory to therapies (11). Despite heterogeneity of molecular presentation of the disease, CLL is typically associated with several immune-related defects ultimately promoting tolerance and tumor progression. Notably, compared to healthy subjects, Tregs are found increased in peripheral blood of CLL patients and associates with disease progression (12). Also, T cells of CLL patients present an exhausted phenotype through the increased expression of immunomodulatory molecules such as TIGIT (13), PD-1 (14) and CTLA-4 (15) and targeting the PD-1/PD-L1 axis protects mice from developing CLL-like disease upon adoptive transfer of mouse leukemic cells (16). Hence, growing evidence of altered T cells immunity in CLL have led to the recent initiation of clinical trials testing various immunotherapies in CLL patients (17).

CD73 is an ecto-nucleotidase that has been extensively demonstrated to promote cancer progression through the production of extracellular adenosine, a potent immunosuppressive molecule. CD73 hydrolyzes adenosine monophosphate (AMP) into adenosine downstream of another nucleotidase, CD39, which converts ATP into ADP and AMP. Adenosine exerts its immunosuppressive effect mainly through activation of high affinity and low affinity adenosine receptors A2a and A2b respectively (18). In addition to its common overexpression within the tumor microenvironment, targeting either molecules from the adenosinergic pathway was extensively reported to provide therapeutic benefits in several solid tumor contexts (19). While targeting the adenosinergic axis is an actively pursued immunotherapeutic avenue in solid tumors, few studies have addressed the relevance of the adenosine pathway in the context of hematological malignancies. In CLL, CD73 was found to mark human leukemic cells with higher turnover and recirculation, aggressive behavior and higher expression of CD38 and ZAP-70, both negative prognostic marker (20). While one study found that high mRNA levels of CD73 in fludarabine-treated CLL patients was associated with longer time to disease progression (21), another study with a slightly larger cohort rather found that high CD73 protein expression was associated with

increased beta-2-microglobulin levels and shorter survival (22). Human CLL cells also express higher levels of A2a receptor than normal B cells and exogenous adenosine blocks spontaneous or drug induced CLL cells apoptosis (23). While CD39 expression on leukemic CLL cells is generally associated with favorable prognosis (24), CD39 expression on T cells from CLL patients is found elevated and correlates with disease stage (25, 26). Furthermore, it was demonstrated that adenosine signaling plays a pivotal role within hypoxic lymphoid niche where CLL proliferates, in favoring type 2 macrophages polarization and Tregs accumulation (27). Lastly, in an adoptively transferred CLL mouse model, A2a blockade was shown to rescue CD8 T cells functions and prevent expansion of Tregs but did not hinder tumor progression (27). Nevertheless, the role - if any - of the CD73-adenosinergic axis in the pathogenesis of CLL is still unclear.

The E μ -TCL1 transgenic mouse model is widely used to study the development of a B cells leukemic disease that resemble of the human aggressive form of CLL (28-30). We thus investigated the role of CD73 in the pathogenesis of CLL by crossing CD73 gene-targeted knockout mice with E μ -TCL1 transgenic mice. We report a sex-biased IFN- γ -dependent increased tumor control in CD73-deficient mice. We further report that elevated levels of CD73 surface expression on human leukemic CLL cells is associated with worse prognosis.

4.4 Material and Methods

4.4.1 Animal experimentation

E μ -TCL1 transgenic mice were bred with CD73^{-/-} and A2a^{-/-} mice. All TCL1-expressing mice developed CLL-like disease with a latency of about 6 months. Disease progression was tracked by monthly/bi-monthly analysis of peripheral blood composition by fluorescent-associated cell sorting (FACS) and sick mice were sacrificed when showing signs precursor for development of moribund state. For some experiments, mice were sacrificed at early or advanced leukemic stages and spleens were harvested for single cell analysis by cytometry. 8 weeks-old healthy control C57Bl/6 were commercially purchased from Jackson Laboratories. For interferon gamma neutralization in vivo, 2 months-old mice were treated intraperitoneally with 200 μ g of anti-IFN- γ monoclonal antibody (α -IFN- γ ; clone H22; BioXCell; #BE0312) twice a week for 10 weeks. For experiments of survival of gonadectomized mice, ovaries or testis were surgically removed under anesthesia, shortly after weaning and genotyping of animals, around 8 weeks of age, according to

institutional procedures. E μ -TCL1 transgenic mice (C57Bl/6 background) were kindly provided by Dr. Carlo Croce (Ohio State University, Columbus, OH, USA). CD73^{-/-} C57Bl/6 mice were obtained from Dr. Linda Thompson (OMRF, Oklahoma City, OK, USA). WT and CD73^{-/-} E μ -TCL1 mice were bred and housed at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM, Montréal, Canada). Animal experimentations were performed in accordance with an Institutional Animal Care and Use Committee.

4.4.2 Human samples

17 cryopreserved blood samples from CLL patients drew upon diagnosis were obtained from the *Banque de cellules leucémiques du Québec* (BCLQ, Montréal, Canada). Leukemic CLL cells (CD19⁺CD5⁺) were sorted for mRNA levels analysis. Additionally, 9 samples kindly provided by Dr. Nathalie Johnson (Jewish General Hospital, Montréal) drawn from CLL patients at diagnosis and upon progression were also analyzed. The use of human samples was approved by an institutional ethics committee under protocols 11-047 and 12-052.

4.4.3 Fluorescence Activated Cell sorting

Following fluorescence-conjugated antibodies were used for flow cytometry: fixable viability dye eF506 (eBio, #65-0866-14), anti-mouse CD5 V450 (BD, #561244), anti-mouse B220 FITC (BD, #553084), anti-mouse CD73 PE-Cy7 (eBio, #25-0731-82), anti-mouse CD39 PerCP-eF710 (eBio; #46-0391-82), anti-mouse CD3 APC (BD, #553066), anti-mouse TCR β APC-Cy7 (BD, #560656), anti-mouse CD4 BUV737 (BD, #612843), anti-mouse CD8 V450 (BD, #560471), anti-mouse FoxP3 Alexa Fluor 488 (eBio, #53-5773-82), anti-mouse CD44 FITC (BD, #561859), anti-mouse CD62L PE-CF594 (BD, #562404), anti-human CD73 APC (BD, #560847), anti-human CD39 PE (BD, #555464), anti-human CD5 V450 (BD, #561154), anti-human CD19 Alexa Fluor 700 (BD, #561031), anti-human CD38 FITC (BioLegend, #303504).

4.4.4 Real time quantitative PCR

RNA was isolated using QIAGEN RNeasy mini kit and quantified using nanodrop. RNA was reverse transcribed using the VILO reverse transcriptase enzyme and genes expression were analyzed using Taqman probes for *NT5E*, *ENTPDI* and *ADORA2A* relative to β -actin using the StepOne PCR machine and software.

4.4.5 Statistical Analysis

Mann-Whitney test was performed when comparing 2 groups. Kruskal-Wallis test and 2-way ANOVA were used when comparing 3 or more groups. All statistical analyses were performed using graph pad prism software (version 9.0.2).

4.5 Results

4.5.1 CD73 and CD39 expression is upregulated on non-leukemic lymphocytes upon disease progression

E μ -TCL1 transgenic mice express the TCL1 oncogene under the control of the IGVH promoter, driving a clonal expansion of CD5⁺ B-1a innate B cells (630). Using CD5, B220 and CD39 as phenotypic markers, we analyzed 3 cell populations in peripheral blood (PB) of E μ -TCL1 mice during disease progression: CLL cells (CD5^{int} B220^{lo/int} CD39^{hi}), normal B cells (nB cells: CD5^{neg} B220^{hi}) and T cells (CD5^{hi} CD220^{neg}) (**Fig S4.1A-B**). This strategy allowed us to follow the natural course of the disease with a steady accumulation of circulating leukemic CLL cells accompanied by a decline in nB cells (**Fig S4.1C**). To reflect changes in both CLL and nB cells, we measured the ratio of CLL cells over nB cells over time, which captures early (6 months) and advanced (12 months) leukemic disease stages (**Fig S4.1D-E**).

To investigate the role of the adenosinergic pathway in CLL progression, we firstly analyzed the protein expression levels of CD73 and CD39 on circulating leukemic CLL cells, nB cells and T cells at early and advanced stages of the disease. On nB and T cells, both CD39 and CD73 expression were upregulated upon disease progression, but not on leukemic CLL cells (**Fig 4.1A-C**). Overall, CD73 and CD39 expression pattern was similar between male and female leukemic mice and levels increased upon disease progression on circulating non-leukemic lymphocytes, indicating that adenosine could modulate CLL disease progression.

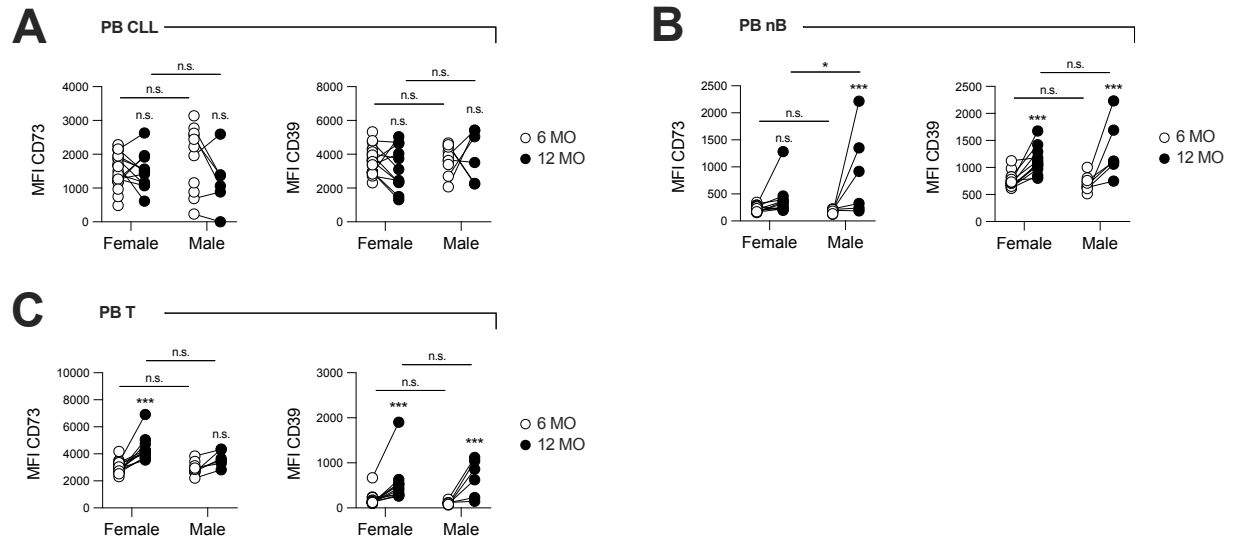


Figure 4.1 – CD73 and CD39 expression is upregulated on non-leukemic lymphocytes upon disease progression. Peripheral blood (PB) cells of male (M) and female (F) $E\mu$ -TCL1 mice was analyzed at early (6 months-old) and advanced (12 months-old) stages of the disease. CD73 (left) and CD39 (right) expression levels showed by mean fluorescence intensity (MFI) on PB (A) leukemic cells (CLL), (B) normal B cells (nB) and (C) pan-T cells. Means \pm SEM are shown (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 by 2-way ANOVA).

4.5.2 *CD73-deficiency prolongs survival of $E\mu$ -TCL1 male mice in an $IFN\text{-}\gamma$ -dependent manner*

We next crossed $E\mu$ -TCL1 mice with $CD73^{-/-}$ mice and analyzed disease progression and survival. We found that $CD73^{-/-}$ $E\mu$ -TCL1 males survived 20% longer than control $E\mu$ -TCL1 males, with median the survival extended of approximately 3 months (Log rank $P=0.002$) (Fig 4.2A). Intriguingly, no survival difference was observed in female mice (Log rank $P=0.54$) (Fig 4.2B). From 6 to 12 months of age, circulating leukemic burden was slightly but not significantly reduced in $CD73^{-/-}$ $E\mu$ -TCL1 males (Fig 4.2C). Consistent with this, nB cells decreased more rapidly in WT males than in $CD73^{-/-}$ males (Fig 4.2D). Disease burden in peripheral blood, as measured by the ratio of leukemic cells to nB cells, was significantly reduced at 12 months of age in $CD73^{-/-}$ $E\mu$ -TCL1 males compared to WT $E\mu$ -TCL1 males (Fig 4.2E). Females, in contrast, showed similar disease burden from 4 to 12 months of age (Fig 4.2F). Of interest, male $CD73^{-/-}$ $E\mu$ -TCL1 mice failed to upregulate CD39 expression on circulating nB cells and pan-T cells upon disease progression, a phenomenon observed in WT $E\mu$ -TCL1 mice (Fig S4.2).

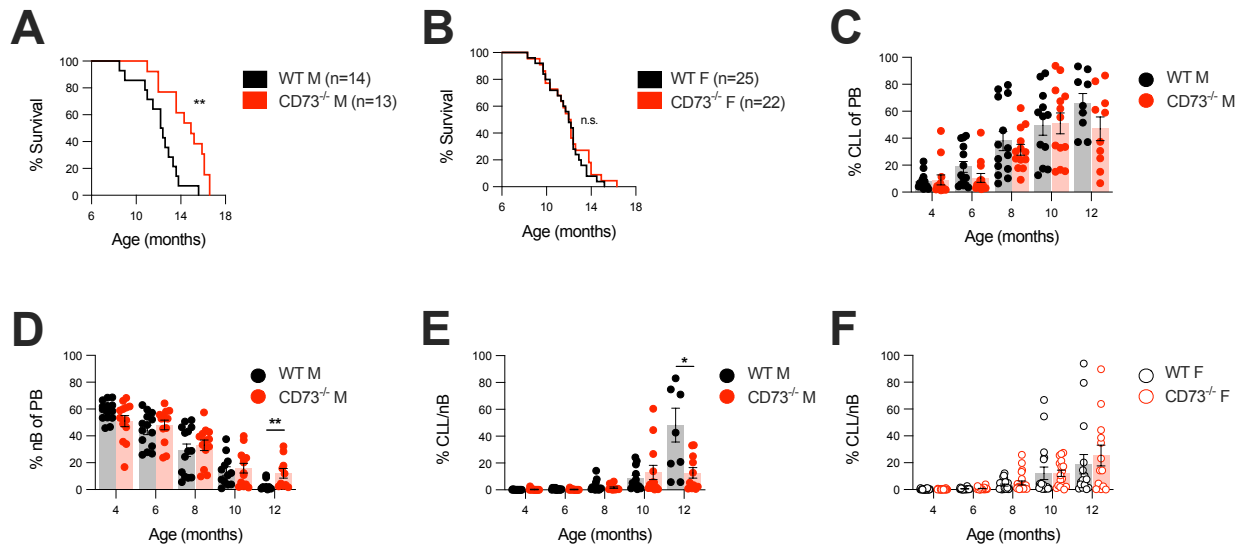


Figure 4.2 – CD73-deficiency prolongs survival of Eμ-TCL1 males. Eμ-TCL1 mice were crossed with CD73^{-/-} mice and leukemia progression was analyzed. **A-B** Survival of WT and CD73^{-/-} Eμ-TCL1 **(A)** males (M) and **(B)** females (F). **C-D** Percentage of circulating **(C)** leukemic cells (CLL) and **(D)** nB cells in PB of WT and CD73^{-/-} Eμ-TCL1 M aged 4 to 12 months-old. **E-F** Disease burden represented as a ratio of CLL cells over nB cells in WT and CD73^{-/-} Eμ-TCL1 **(E)** males and **(F)** females aged 4 to 12 months-old. Means +/- SEM are shown (*p<0.05; **p<0.01 by Log-rank **(A-B)** or Mann-Whitney test **(C-F)**).

CLL cells are known to alter T cells functions in both humans and Eμ-TCL1 transgenic mice. Notably, Eμ-TCL1 mice display enhanced antigen-experienced memory T cells, reduced CD4/CD8 ratios in lymphoid organs and T cell exhaustion (591, 633-635). While no difference in the percentages of splenic CD8, CD4 or Tregs was observed (**Fig 4.3A-B**), we observed a significant increase in ratios of effector (CD44⁺CD62L⁻) to central memory (CD44⁺CD62L⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T cells in CD73^{-/-} Eμ-TCL1 mice compared to WT controls (**Fig 4.3C and S4.3**). As this could reflect increased immune surveillance in CD73-deficient mice, we tested the hypothesis that CD73 suppressed anti-CLL immune responses via IFN-γ (223). For this purpose, we treated 10 weeks-old WT and CD73^{-/-} Eμ-TCL1 male mice with anti-IFN-γ neutralizing mAb for 10 weeks and monitored ensuing disease progression as previously. Strikingly, CD73^{-/-} Eμ-TCL1 male mice in which IFN-γ was neutralized were no longer protected and displayed increased peripheral blood tumor burden (**Fig 4.3D-E**) and a shortened survival comparable to WT control mice (**Fig 4.3F**).

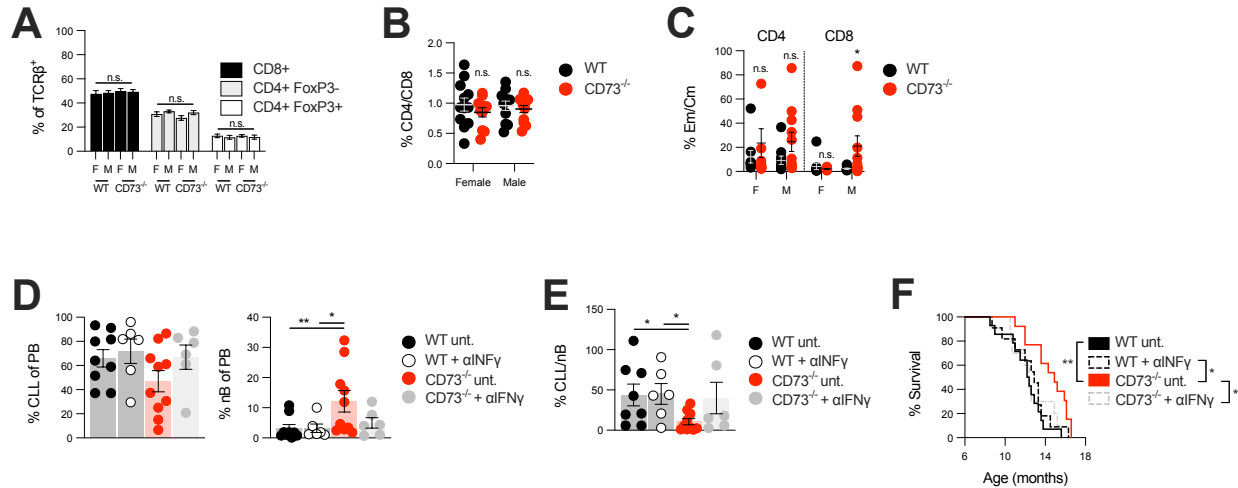


Figure 4.3 – CD73^{-/-} E μ -TCL1 males display increased splenic T cells shift toward effector phenotype and IFN- γ neutralization abrogates their prolonged survival. Splenic T cells compositions of 8 months-old WT and CD73^{-/-} E μ -TCL1 mice were analyzed by cytometry. **A** Percentage of CD8⁺, CD4⁺ FoxP3⁻ non-Tregs and CD4⁺ FoxP3⁺ Tregs out of TCR β ⁺ splenic T cells in WT and CD73^{-/-} E μ -TCL1 mice. **B** Ratio of percentage of CD4⁺ over CD8⁺ splenic T cells in WT and CD73^{-/-} E μ -TCL1 mice. **C** Ratio of effector memory (CD44⁺CD62L⁻) to central memory (CD44⁺CD62L⁺) CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells in WT and CD73^{-/-} E μ -TCL1 mice. **D** Percentages of circulating CLL cells (left panel) and nB cells (right panel) out of PB and **(E)** ratio of circulating CLL cells to nB cells of WT and CD73^{-/-} E μ -TCL1 males treated with anti-interferon gamma (α -IFN- γ) compared to historical untreated controls. **F** Survival of WT and CD73^{-/-} E μ -TCL1 males treated with α -IFN- γ compared to historical untreated controls. Means \pm SEM are shown (* p <0.05; ** p <0.01 by Mann-Whitney test (A-C), Kruskal-Wallis (D-E) and Log-rank (F)).

4.5.3 Sex-dependent hormone production ablation does not influence survival of E μ -TCL1 model

To further understand how sex influences immunosurveillance in CD73-deficient mice, we surgically gonadectomized young WT and CD73^{-/-} E μ -TCL1 mice and compared disease development to historical non-gonadectomized controls. Neither WT nor CD73^{-/-} E μ -TCL1 ovariectomized females, or castrated males, displayed a significant difference in survival compared to non-gonadectomized controls (**Fig S4.4**). Notably, CD73^{-/-} castrated E μ -TCL1 males survived significantly longer than WT E μ -TCL1 mice (Log rank P =0.04). These results suggest that CD73-deficiency prolongs survival of E μ -TCL1 males independently of hormonal regulation.

4.5.4 CD73 expression on leukemic cells is associated with worse prognosis in CLL patients

Next, we compared gene expression levels of CD73 (*NT5E*), CD39 (*ENTPD1*) and A2a (*ADORA2A*) in high and low risk CLL patients. From 134 untreated CLL patients with whole exome sequencing data (826-828), 87 belonged to the IGHV-mutated low-risk group versus 43 to the IGHV-unmutated high-risk group (4 had an unknown IGHV-mutational status) and 10 belonged to the TP53-mutated high-risk group versus 124 to the TP53-unmutated low-risk group.

While neither CD73 nor CD39 were differentially expressed between high- and low-risk patients, higher *ADORA2A* gene expression was found significantly associated with IGHV-unmutated and TP53-mutated patients (**Fig S4.5A-B**).

We then analyzed CD73 and CD39 protein expression by flow cytometry in blood samples of CLL patients collected at diagnosis (UNT; n=4), after 1 cycle of chemotherapy (C1; n=5) and upon disease progression (Table 4.1). CD73 and CD39 expression levels on leukemic cells (CD5⁺CD19⁺), pan-T cells (CD5⁺CD19⁻) and normal B cells (CD5⁻CD19⁺) were not found to change significantly upon relapse in both patients that received prior treatments (C1) or not (UNT) (**Fig S4.6A-C**). Interestingly, both CD73 and CD39 positively correlated with CD38 expression, a validated clinical marker predictor of poor outcome (**Fig S4.6D**). CD73, but not CD39, expression levels on leukemic cells negatively correlated, although not significantly, with time to relapse (**Fig 4.4A and S4.6E**).

Table 4.1. CLL samples characteristics

Paired samples n=9		Untreated	Post Cycle 1	
	N	4	5	
	Male/Female	4/0	2/3	
	Mean time to relapse (yr)	3.5	1.6	
Unpaired samples n=17		Alive	Dead	
	N	10	7	
	Male/Female	8/2	7/0	
	Sampling year	2007 ± 2.6	2005 ± 3.7	n.s.
	Range	2004-2013	2002-2013	

Finally, we used a larger cohort of untreated CLL patients sampled at diagnosis between 2002 and 2013 (**Table 4.1**), measured CD73, CD39 and A2a expression on leukemic cells and correlated levels to survival status at last follow-up (January 2018). In deceased patients, we observed significantly increased protein and gene expression for CD73 (*NT5E*) on sorted leukemic cells, but no difference was observed for CD39 (*ENTPD1*) or A2a adenosine receptor (*ADORA2A*) expression (**Fig 4.4B-C**). Altogether, these results suggest that CD73 expression levels on human leukemic cells at diagnosis may predict worse outcome in CLL patients.

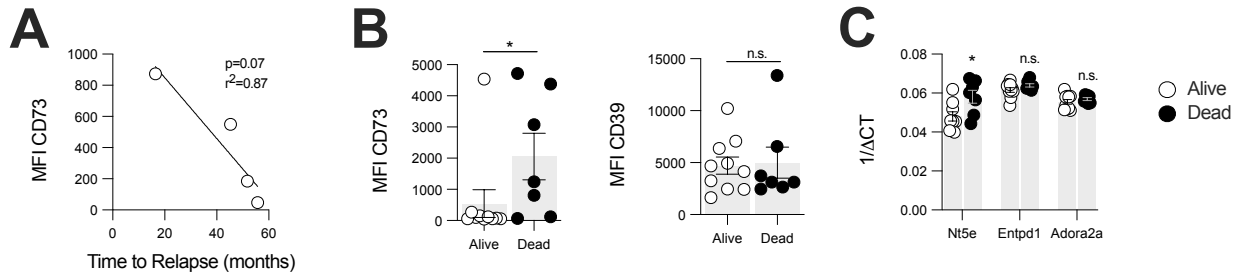


Figure 4.4 – CD73 may predict for worse outcome in CLL patients. Human blood samples from CLL patients sampled early (at diagnosis) were analyzed for CD73 and CD39 expression. **A** Correlation between CD73 expression levels on leukemic cells from patients sampled at diagnosis (with no prior treatment; n=4) and time to relapse in months. **B** CD73 (left panel) and CD39 (right panel) expression levels (MFI) on leukemic cells from patients sampled between 2002 and 2013 (BCLQ) that were either alive or dead in 2018. **C** Gene expression levels of CD73 (*NT5E*), CD39 (*ENTPD1*) and A2a (*ADORA2A*) on sorted leukemic cells from patients included in **B**. Means +/- SEM are shown (* $p < 0.05$ by Mann-Whitney test (**B-C**)).

4.6 Discussion

CLL is characterized by inefficient anti-tumor immune surveillance (12-17, 33). Yet, the presence of CD8⁺ T cells expansion and T eff differentiation observed in CLL patients and preclinical studies suggest that immunotherapies can reestablish antitumor immunity (35, 40). Using the well-established E μ -TCL1 transgenic mouse model that recapitulates a B cell hyperplasia akin to CLL disease in human, we report that targeting CD73 could be a promising avenue to enhance antitumor immune control in CLL. We first investigated expression profile of enzymes involved in generation of adenosine, CD39 and CD73, and observed that CD39 is a robust marker for leukemic CLL cells in E μ -TCL1 mouse model whereas CD73 is heterogeneously expressed (**Fig 4.1 & S4.1**). As recently reported by Arruga et al. (27) in adoptively transferred leukemic mice, we observed an up-regulation of both CD73 and CD39 on circulating non-leukemic B and T lymphocytes upon CLL disease progression. In contrast to Arruga et al., we did not observe an increase in CD73 or CD39 expression on leukemic B cells in the leukemic E μ -TCL1 mouse model upon disease progression (**Fig 4.1**). We also did not observe any upregulation of CD73 or CD39 on leukemic cells upon disease progression in CLL patients. However, we observed a strong expression of both CD39 and CD73 in the CLL microenvironment in both E μ -TCL1 mice and human CLL samples (**Fig 4.1 and 4.4**).

An important finding of our study is that CD73-deficient E μ -TCL1 males exhibits an IFN γ -dependent enhanced tumor control and survive significantly longer than WT control mice (**Fig 4.2**

and 4.3). Our findings are in accordance with previous studies reporting an important role of A2a in CLL pathogenesis (23). A2a blockade, while restoring immune cell functions, was however not sufficient to decrease tumor burden load in an adoptively transferred CLL mouse model (27). Alternatively, A2b signaling was also described to drive myeloid cells-mediated immunosuppression in various mouse cancer models (41-43). In addition to macrophages (44), dendritic cells (45) and microglial cells (46), A2b signaling drives cervical cancer cells' IL-10 production (47). Both human and mouse E μ -TCL1-derived CLL cells constitutively produce IL-10 to hinder antitumor immunity and CLL cell growth is reduced in IL-10R^{-/-} mice through enhanced immune control with mice showing increased IFN γ -producing CD4 and CD8 T cells (48). The role of A2b signaling in CLL pathogenesis has yet to be studied but targeting CD73 upstream of adenosine receptor-signaling might prove more efficient in controlling CLL progression than single A2a-blockade.

By studying splenic composition in aged leukemic E μ -TCL1 mice, we report that male CD73^{-/-} E μ -TCL1 mice display increased skewing of both CD4 and CD8 T cells toward effector phenotype compared to female CD73^{-/-} and both male and female WT leukemic mice (**Fig 4.3**). Supporting the hypothesis that prolonged survival in CD73^{-/-} E μ -TCL1 male mice stems from enhanced tumor immune control, reduced splenic ratios of effector to central memory CD8 T cells was also observed in IRF4^{-/-} E μ -TCL1 transgenic mice in which enhanced tumor evasion is associated with shorter survival time (49). Consistently, low IRF4 mRNA was further found associated with reduced effector memory to central memory ratios of CD4 and CD8 T cells and shorter time to first therapy in human CLL patients (49).

It's unclear why CD73^{-/-} E μ -TCL1 female mice do not control disease as well as CD73^{-/-} leukemic males and ultimately show no survival benefit when compared to WT mice. Few studies have investigated the relative importance of adenosinergic axis between males and females. On the one hand, estrogen receptor signaling was found to maintain osteoclasts' CD73 and CD39 expression during post-menopausal bone loss (50) and estrogen receptor β 2, but not β 1, is found upregulated in CLL patients' peripheral blood mononuclear cells compared to healthy controls (51). However, in WT E μ -TCL1 mice, we did not observe differential CD73 expression between male and female suggesting no hormonal regulation of CD73 expression on leukemic cells.

Moreover, neither male castration nor female ovariectomy had any effect on disease progression of WT or CD73^{-/-} E μ -TCL1 mice, suggesting that CD73 expression and contribution to CLL pathogenesis in male mice is independent from hormonal signaling. In a recent study, hepatocyte-targeted CD73 deletion resulted in increased severity of spontaneously developed liver disease in males compared to female mice (52). The authors noted a compensatory upregulation of *ENTPDI* (CD39) and all four adenosine receptors in females' CD73-deficient hepatocytes (52). While a compensatory upregulation of CD39 was not observed on CLL cells from E μ -TCL1 CD73^{-/-} females compared to males in our study, increased expression of adenosine receptors in female leukemic mice could help potentiate adenosine signaling since other enzymes with AMPase activity can partially compensate for loss of CD73-mediated adenosine production (53). Another study found that mRNA levels of the tissue non-specific phosphatase (TNAP) was upregulated in the hippocampus of CD73^{-/-} male, but not female mice (54). In contrast, another study found no TNAP compensation in kidneys of CD73^{-/-} mice (55). It remains unknown whether E μ -TCL1 females deficient for CD73 maintain adenosine signaling through compensatory mechanisms involving other AMPase enzymes or adenosine receptor in CLL microenvironment. Tissue- or cell- specific CD73 targeted deletion might help better understand how CD73 contributes to CLL pathogenesis in male and female mice. Using an induced metastasis mouse model, a recent study reported increased IL-10 levels and infiltration of IL-10-producing macrophages in the tumor microenvironment of tumor-bearing female in comparison to male mice (56). Given IL-10's role in CLL pathogenesis as discussed previously (48), if this observation is conserved in E μ -TCL1 mice, one can hypothesize that CD73-deficiency in female might not suffice to overcome IL-10 mediated responses in E μ -TCL1 mice.

In human CLL blood samples, we found CD73 expression levels to correlate with the poor prognosis marker CD38, consistent with another report (20). While our small cohort size does not provide sufficient power for proper prognostic evaluation, we found that CD73 expression levels on leukemic cells of untreated patients to be associated (non-significantly) with shorter time to relapse (**Fig 4.4**). Although CD39 expression was also correlated with CD38, higher CD39 did not trend toward shorter time to relapse. Neither CD73 nor CD39 were found to be significantly upregulated upon disease progression on either leukemic CLL cells or non-leukemic T and B cells. A limitation of our analysis, however, is that all samples included in the paired analysis originated

from blood. Whether the adenosinergic axis is up- or down- regulated in other lymphoid organs is unknown.

Overall, our study identifies for the first time a sex-biased protective role for CD73-deficiency in enhancing tumor control of leukemic cells in the E μ -TCL1 transgenic mouse model. While it's unclear why CD73-deficiency does not protect female E μ -TCL1 mice, our study highlights the importance of integrating sex differences when studying CD73-ADO axis. Also, given that CLL more commonly affect male patients and women usually experience a more benign clinical course (57), our findings prompt further investigation of therapeutic potential of targeting CD73 in CLL disease. Further studies should thus explore either mono or combinatorial therapy encompassing CD73-adenosine targeting in CLL while keeping sex differences in mind.

4.7 Acknowledgements

The authors thank Dominique Gauchat, Philippe St-Onge, Suzanne Vincent and Loise Gilbert for technical assistance. The study was funded by the Leukemia and Lymphoma Society of Canada. DA and MAB were on a FRQS scholarship.

4.8 References

1. Dong Y, Shi O, Zeng Q, Lu X, Wang W, Li Y, et al. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Exp Hematol Oncol.* 2020;9:14.
2. Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma.* 2006;47(8):1477-80.
3. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1995;333(16):1052-7.
4. Milne K, Sturrock B, Chevassut T. Chronic Lymphocytic Leukaemia in 2020: the Future Has Arrived. *Curr Oncol Rep.* 2020;22(4):36.
5. Bobrowicz M, Dwojak M, Pyrzynska B, Stachura J, Muchowicz A, Berthel E, et al. HDAC6 inhibition upregulates CD20 levels and increases the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Blood.* 2017;130(14):1628-38.
6. Marquez ME, Hernandez-Uzategui O, Cornejo A, Vargas P, Da Costa O. Bone marrow stromal mesenchymal cells induce down regulation of CD20 expression on B-CLL: implications for rituximab resistance in CLL. *Br J Haematol.* 2015;169(2):211-8.
7. Klein C, Jamois C, Nielsen T. Anti-CD20 treatment for B-cell malignancies: current status and future directions. *Expert Opin Biol Ther.* 2021;21(2):161-81.
8. O'Brien S, Furman RR, Coutre S, Flinn IW, Burger JA, Blum K, et al. Single-agent ibrutinib in treatment-naive and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. *Blood.* 2018;131(17):1910-9.
9. Williams AM, Baran AM, Schaffer M, Bushart J, Rich L, Moore J, et al. Significant weight gain in CLL patients treated with Ibrutinib: A potentially deleterious consequence of therapy. *Am J Hematol.* 2020;95(1):E16-E8.
10. Strati P, Parikh SA, Chaffee KG, Kay NE, Call TG, Achenbach SJ, et al. Relationship between co-morbidities at diagnosis, survival and ultimate cause of death in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a prospective cohort study. *Br J Haematol.* 2017;178(3):394-402.
11. D'Souza P, Walker G. Spotlight on chronic lymphocytic leukemia: a Pharma Matters report. *Drugs Today (Barc).* 2014;50(7):485-501.
12. D'Arena G, Simeon V, D'Auria F, Statuto T, Sanzo PD, Martino LD, et al. Regulatory T-cells in chronic lymphocytic leukemia: actor or innocent bystander? *Am J Blood Res.* 2013;3(1):52-7.
13. Catakovic K, Gassner FJ, Ratswohl C, Zaborsky N, Rebhandl S, Schubert M, et al. TIGIT expressing CD4+T cells represent a tumor-supportive T cell subset in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology.* 2017;7(1):e1371399.
14. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood.* 2012;120(7):1412-21.
15. Motta M, Rassenti L, Shelvin BJ, Lerner S, Kipps TJ, Keating MJ, et al. Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2005;19(10):1788-93.
16. McClanahan F, Hanna B, Miller S, Clear AJ, Lichter P, Gribben JG, et al. PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2015;126(2):203-11.
17. Arruga F, Gyau BB, Iannello A, Vitale N, Vaisitti T, Deaglio S. Immune Response Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia: Dissecting Molecular Mechanisms and Microenvironmental Conditions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5).
18. Allard D, Turcotte M, Stagg J. Targeting A2 adenosine receptors in cancer. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(4):333-9.
19. Allard B, Allard D, Buisseret L, Stagg J. Publisher Correction: The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(10):650.
20. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, et al. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood.* 2011;118(23):6141-52.
21. Mackey JR, Galmarini CM, Graham KA, Joy AA, Delmer A, Dabbagh L, et al. Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): identification of fludarabine-sensitive and -insensitive populations. *Blood.* 2005;105(2):767-74.
22. Kicova M, Michalova Z, Coma M, Gabzdilova J, Dedinska K, Guman T, et al. The expression of CD73 on pathological B-cells is associated with shorter overall survival of patients with CLL. *Neoplasma.* 2020;67(4):933-8.
23. Serra S, Vaisitti T, Audrito V, Bologna C, Buonincontri R, Chen SS, et al. Adenosine signaling mediates hypoxic responses in the chronic lymphocytic leukemia microenvironment. *Blood Adv.* 2016;1(1):47-61.

24. Vaisitti T, Arruga F, Deaglio S. Targeting the Adenosinergic Axis in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Way to Disrupt the Tumor Niche? *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).
25. Abousamra NK, Salah El-Din M, Hamza Elzahaf E, Esmael ME. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (E-NTPDase1/CD39) as a new prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(1):113-9.
26. Pulte D, Furman RR, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Ballard HS, Olson KE, et al. CD39 expression on T lymphocytes correlates with severity of disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011;11(4):367-72.
27. Arruga F, Serra S, Vitale N, Guerra G, Papait A, Baffour Gyau B, et al. Targeting of the A2A adenosine receptor counteracts immunosuppression in vivo in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2021;106(5):1343-53.
28. Yan XJ, Albesiano E, Zanasi N, Yancopoulos S, Sawyer A, Romano E, et al. B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(31):11713-8.
29. Hamblin TJ. The TCL1 mouse as a model for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2010;34(2):135-6.
30. Johnson AJ, Lucas DM, Muthusamy N, Smith LL, Edwards RB, De Lay MD, et al. Characterization of the TCL-1 transgenic mouse as a preclinical drug development tool for human chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006;108(4):1334-8.
31. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(10):6955-60.
32. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgun G, Le Dieu R, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2427-37.
33. McClanahan F, Riches JC, Miller S, Day WP, Kotsiou E, Neuberg D, et al. Mechanisms of PD-L1/PD-1-mediated CD8 T-cell dysfunction in the context of aging-related immune defects in the Emicro-TCL1 CLL mouse model. *Blood.* 2015;126(2):212-21.
34. Gassner FJ, Zaborsky N, Catakovic K, Rebhandl S, Huemer M, Egle A, et al. Chronic lymphocytic leukaemia induces an exhausted T cell phenotype in the TCL1 transgenic mouse model. *Br J Haematol.* 2015;170(4):515-22.
35. Hofbauer JP, Heyder C, Denk U, Kocher T, Holler C, Trapin D, et al. Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL. *Leukemia.* 2011;25(9):1452-8.
36. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.* 2011;71(8):2892-900.
37. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature.* 2015;526(7574):525-30.
38. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):p11.
39. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-4.
40. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood.* 2013;121(9):1612-21.
41. Cekic C, Sag D, Li Y, Theodorescu D, Strieter RM, Linden J. Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. *J Immunol.* 2012;188(1):198-205.
42. Ryzhov S, Novitskiy SV, Goldstein AE, Biktasova A, Blackburn MR, Biaggioni I, et al. Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells. *J Immunol.* 2011;187(11):6120-9.
43. Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S. Blockade of A2b adenosine receptor reduces tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of melanoma. *Neoplasia.* 2013;15(12):1400-9.
44. Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, et al. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol.* 2005;175(12):8260-70.
45. Wilson JM, Ross WG, Agbai ON, Frazier R, Figler RA, Rieger J, et al. The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J Immunol.* 2009;182(8):4616-23.
46. Koscsó B, Csoka B, Selmeczy Z, Himer L, Pacher P, Virag L, et al. Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *J Immunol.* 2012;188(1):445-53.

47. Torres-Pineda DB, Mora-Garcia ML, Garcia-Rocha R, Hernandez-Montes J, Weiss-Steider B, Montesinos-Montesinos JJ, et al. Adenosine augments the production of IL-10 in cervical cancer cells through interaction with the A2B adenosine receptor, resulting in protection against the activity of cytotoxic T cells. *Cytokine*. 2020;130:155082.
48. Alhakeem SS, McKenna MK, Oben KZ, Noothi SK, Rivas JR, Hildebrandt GC, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia-Derived IL-10 Suppresses Antitumor Immunity. *J Immunol*. 2018;200(12):4180-9.
49. Asslaber D, Qi Y, Maeding N, Steiner M, Denk U, Hopner JP, et al. B-cell-specific IRF4 deletion accelerates chronic lymphocytic leukemia development by enhanced tumor immune evasion. *Blood*. 2019;134(20):1717-29.
50. Shih YV, Liu M, Kwon SK, Iida M, Gong Y, Sangaj N, et al. Dysregulation of ectonucleotidase-mediated extracellular adenosine during postmenopausal bone loss. *Sci Adv*. 2019;5(8):eaax1387.
51. Yakimchuk K, Norin S, Kimby E, Hagglund H, Warner M, Gustafsson JA. Up-regulated estrogen receptor beta2 in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(1):139-44.
52. Alcedo KP, Rouse MA, Jung GS, Fu D, Minor M, Willcockson HH, et al. CD73 Maintains Hepatocyte Metabolic Integrity and Mouse Liver Homeostasis in a Sex-Dependent Manner. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;12(1):141-57.
53. Jin H, St Hilaire C, Huang Y, Yang D, Dmitrieva NI, Negro A, et al. Increased activity of TNAP compensates for reduced adenosine production and promotes ectopic calcification in the genetic disease ACDC. *Sci Signal*. 2016;9(458):ra121.
54. Wang Y, Copeland J, Shin M, Chang Y, Venton BJ. CD73 or CD39 Deletion Reveals Different Mechanisms of Formation for Spontaneous and Mechanically Stimulated Adenosine and Sex Specific Compensations in ATP Degradation. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(6):919-28.
55. Jackson EK, Cheng D, Verrier JD, Janesko-Feldman K, Kochanek PM. Interactive roles of CD73 and tissue nonspecific alkaline phosphatase in the renal vascular metabolism of 5'-AMP. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307(6):F680-5.
56. Ray AL, Nofchissey RA, Khan MA, Reidy MA, Lerner MR, Wu X, et al. The role of sex in the innate and adaptive immune environment of metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2020;123(4):624-32.
57. Catovsky D, Wade R, Else M. The clinical significance of patients' sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(6):1088-94.

4.9 Supplementary figures

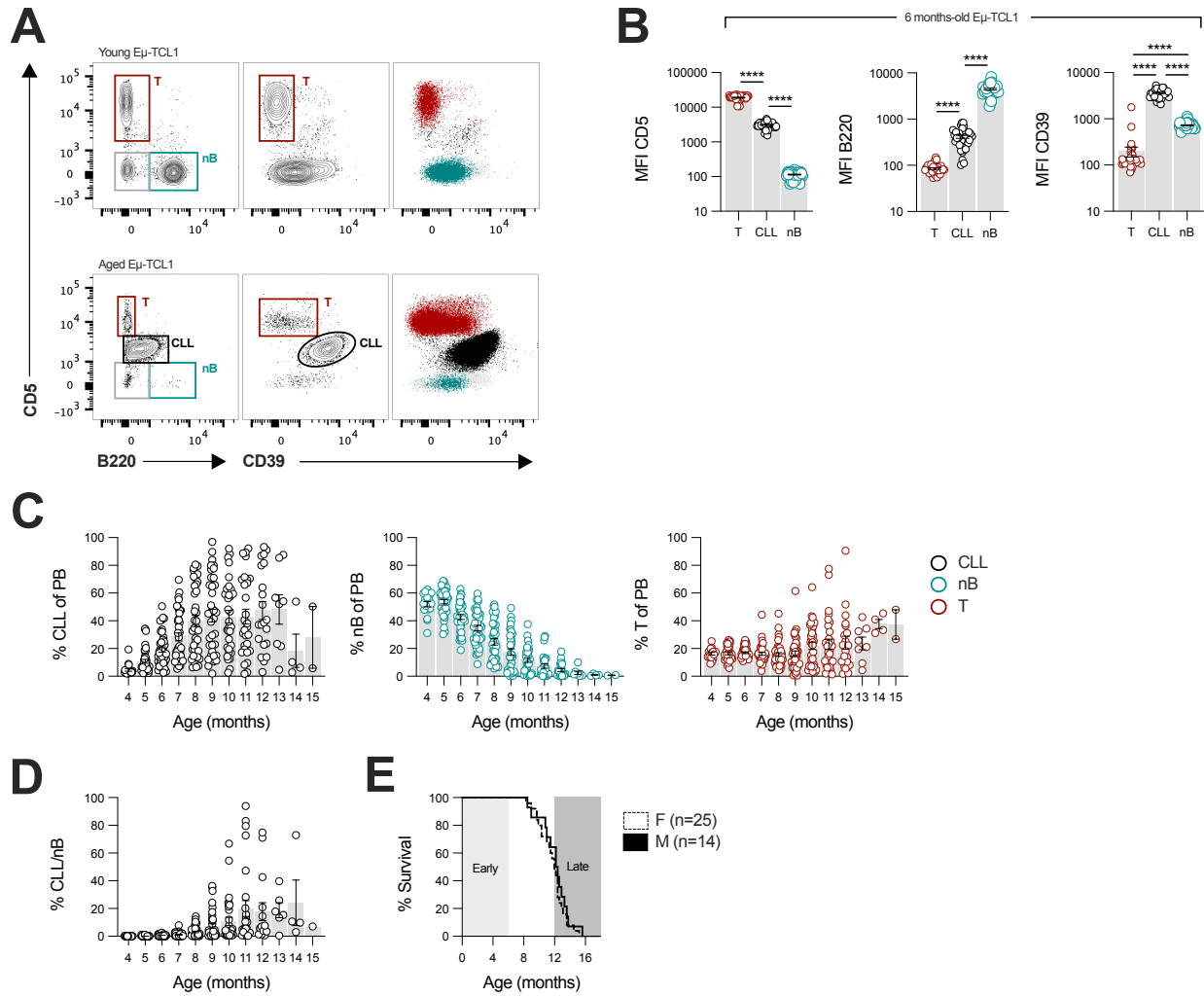


Figure S4.1 – Characterization of the Eμ-TCL1 mouse model and gating strategy of leukemic CLL and normal B and T cells using CD5, B220 and CD39 phenotypic markers. A Peripheral blood (PB) from young (2 months-old) and aged (12 months-old) Eμ-TCL1 mice was analyzed by flow cytometry using anti- CD5, B220 and CD39 fluorescent antibodies. Example of the gating strategy employed to delineate circulating populations is shown. **B** Mean fluorescence intensity (MFI) of CD5, B220 and CD39 on leukemic cells (CLL), nB cells and T cells. **C** Percentage of leukemic cells, nB cells and T cells in PB of Eμ-TCL1 mice over time. **D** Ratio of leukemic CLL cells over nB cells populations in PB of Eμ-TCL1 mice over time. **E** Survival of males and females Eμ-TCL1 mice. Means +/- SEM are shown (****p<0.0001 by Kruskal-Wallis).

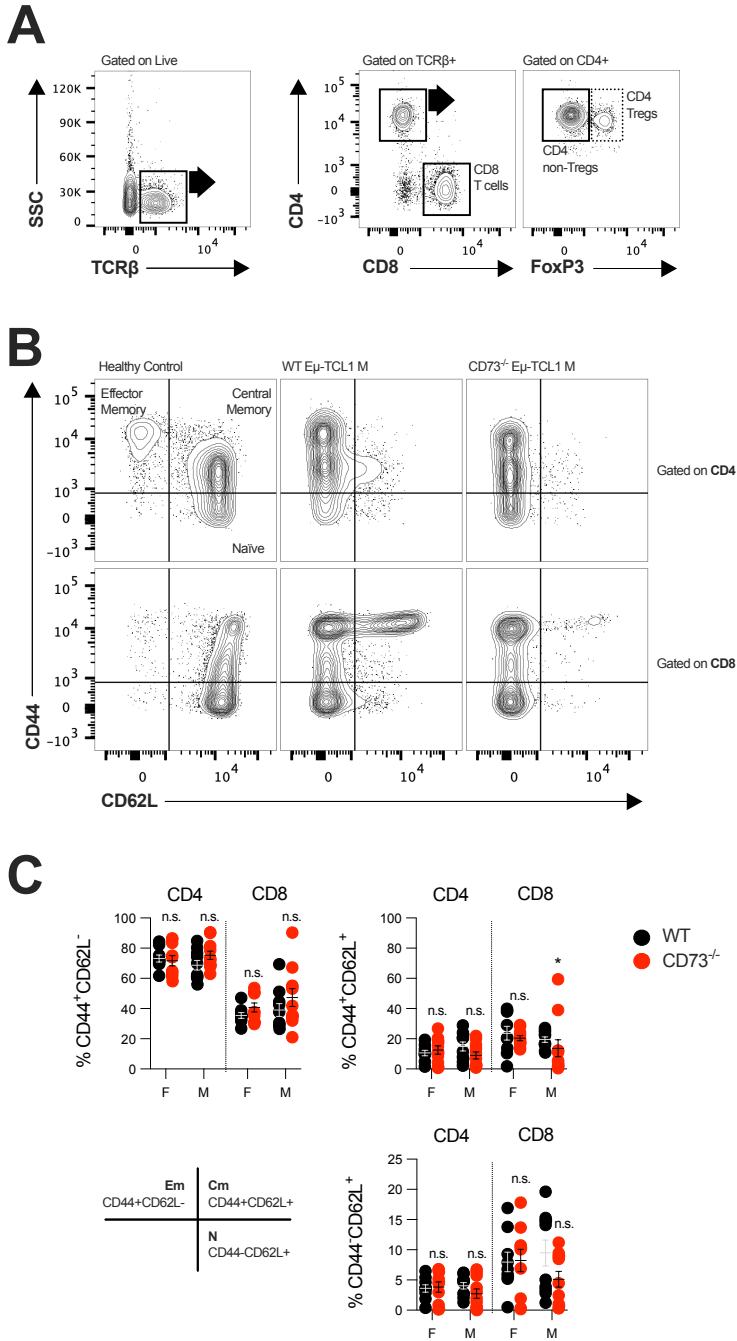


Figure S4.3 – Splenocyte phenotypic characterization of 8 months-old Eμ-TCL1 mice. 8 months-old WT and CD73^{-/-} Eμ-TCL1 mice were sacrificed and spleens' single cell suspensions were analyzed by cytometry. **A** Example of gating strategy for identification of CD8⁺, CD4⁺ FoxP3⁺ T cells and CD4⁺ FoxP3⁺ Tregs. **B** Examples of gating strategy to define effector memory (CD44⁺CD62L⁻), central memory (CD44⁺CD62L⁺) or naïve (CD44⁻CD62L⁺) phenotype of CD4⁺ (top panels) and CD8⁺ (bottom panels) splenic T cells. 8 weeks-old C57Bl/6 Eμ-TCL1⁻ mice were used as healthy control. **C** Percentages of effector memory (CD44⁺CD62L⁻), central memory (CD44⁺CD62L⁺) and naïve (CD44⁻CD62L⁺) CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells. Means +/- SEM are shown (*p<0.05 by Mann-Whitney test).

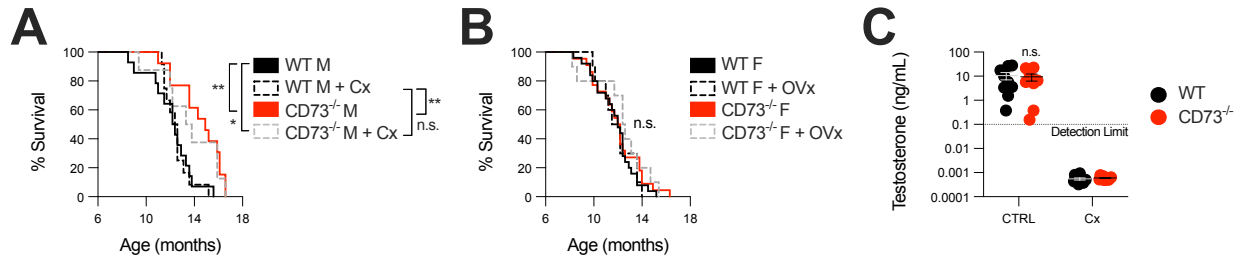


Figure S4.4 – Sex-dependent hormones-ablation do not influence CLL-like disease in E μ -TCL1 mice. Young (8 weeks-old) WT and CD73^{-/-} E μ -TCL1 males and females were surgically castrated (Cx, WT n=12; CD73^{-/-} n=8) or ovariectomized (OVx, WT n=10; CD73^{-/-} n=10) and survival was compared to historical control WT and CD73^{-/-} non-gonadectomized E μ -TCL1 (A) males and (B) females. C Serum levels of testosterone in castrated E μ -TCL1 males compared to non-castrated controls were measured by ELISA according to the manufacturer’s protocol (Abcam, #ab108666). Means +/- SEM are shown (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 by Mann-Whitney test (C) or Log-rank (A-B)).

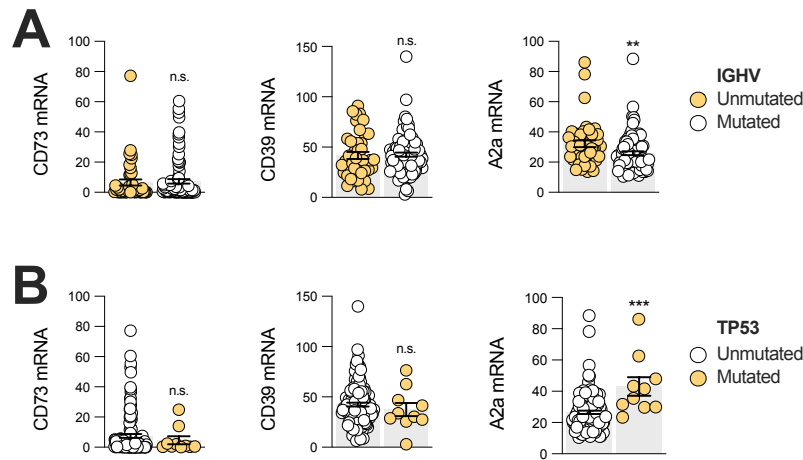


Figure S4.5 – CD73, CD39 and A2a mRNA levels in CLL patients with poor prognostic mutational status. Whole exome sequencing from 134 untreated CLL patients (37) publicly available through the cBio Cancer Genomics Portal (38, 39) was used to compared mRNA levels (z-scores) of CD73 (*NT5E*), CD39 (*ENTPD1*) and A2a (*ADORA2A*) between high (orange) and low (white) risk patients. A CD73, CD39 and A2a gene expression levels in IGHV-mutated (low risk; n=87) and unmutated (high risk; n=43) patients. B CD73, CD39 and A2a gene expression levels in TP53-mutated (high risk; n=10) and unmutated (low risk; n=124) patients. Means +/- SEM are shown (**p<0.01; ***p<0.001 by Mann-Whitney test).

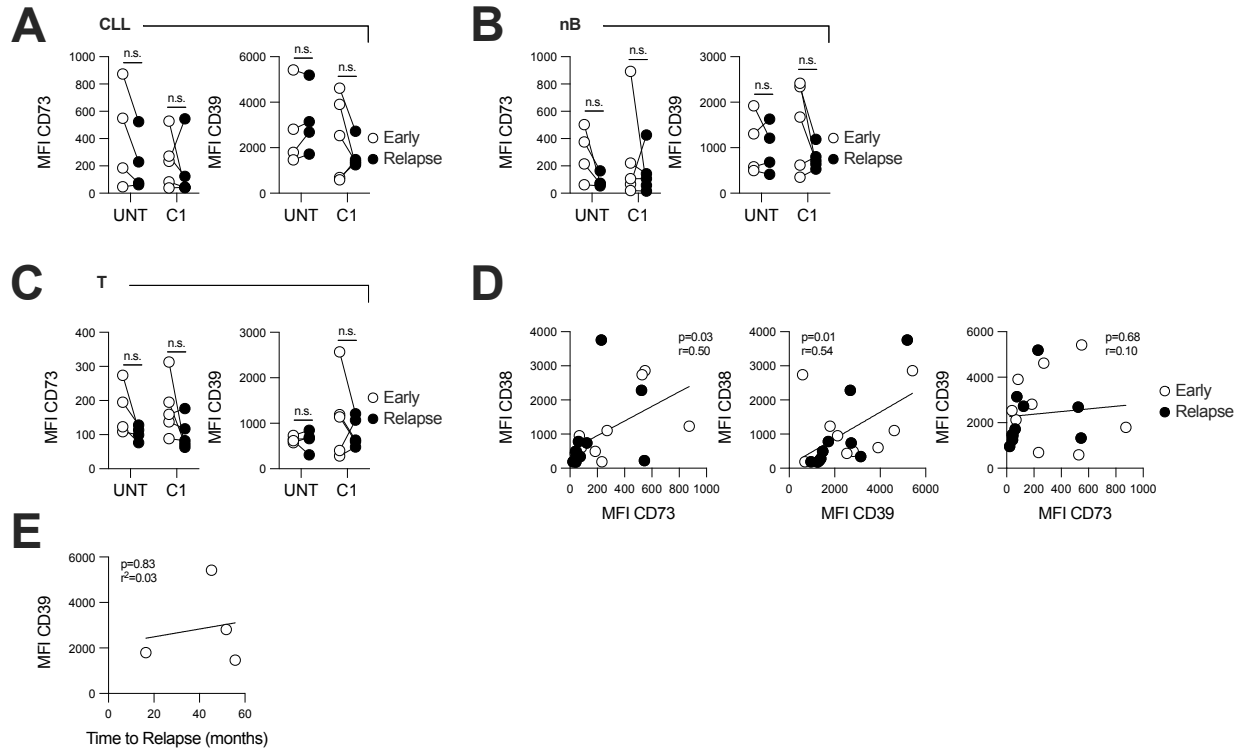


Figure S4.6 – CD73, CD39 and A2a expression pattern in CLL patients. Human blood samples from 9 CLL patients sampled early at diagnosis (UNT, n=4) or after 1st chemotherapy cycle (C1, n=5) and upon relapse were analyzed for CD73 and CD39 expression. **A-C** CD73 (left) and CD39 (right) expression on **(A)** leukemic cells (CLL: CD5⁺CD19⁺), **(B)** nB cells (CD5⁻CD19⁺) and **(C)** pan-T cells (CD5⁺CD19⁻) prior to and upon relapse. **D** Correlation between CD38 and CD73 (left panel), CD38 and CD39 (middle panel) and CD39 and CD73 (right panel) expression levels on leukemic cells. Linear regression combines leukemic cells sampled early and upon relapse of all 9 patients (n=18). **E** Correlation between time to relapse in months and CD39 expression levels on leukemic cells from patients sampled at diagnosis with no prior treatment (UNT, n=4). Means +/- SEM are shown (2-way ANOVA (A-C)).

4.10 Résultats connexes

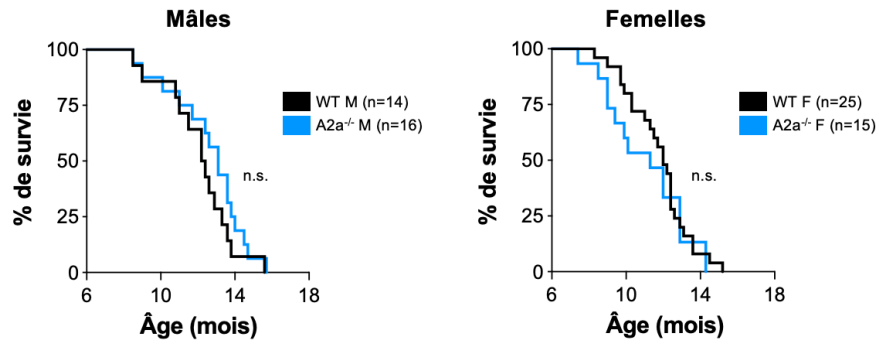


Figure C4.1 – Les souris transgéniques $E\mu$ -TCL1 mâles ou femelles ne présentent pas d'avantage de survie en absence du récepteur A2a. La survie des souris leucémiques issues du croisement $E\mu$ -TCL1 x A2a^{-/-} a été étudiée comme à la figure 4.2.

Chapitre 5 – CD73 promotes cellular metabolic fitness independently of adenosine signaling

David Allard^{1,2,3}, Isabelle Cousineau^{1,3}, Eric Ma⁴, Yacine Barèche^{1,3}, Hubert Fleury^{1,3}, Russell Jones⁴ and John Stagg^{1,2,3}

¹ Centre de Recherche du Centre Hospitalier l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

² Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁴ Van Andel Institute, Grand Rapids, MI, USA

Funding: This work was supported by the CIHR.

Competing interests: John Stagg is consultant, Scientific Advisory Board member and received Research grants from Surface Oncology.

5.1 Résumé

L'enzyme CD73 joue un rôle important dans l'immunité antitumorale via la production d'adénosine. Il demeure incertain si et comment CD73 contribue à la progression tumorale au-delà de son rôle immunosuppresseur. Nous avons étudié le rôle de CD73 dans la régulation métabolique des cellules cancéreuses en générant des lignées déficientes pour CD73 via la technologie CRISPR-Cas9 ainsi qu'en ciblant l'enzyme CD73 à l'aide d'un anticorps monoclonal. Des analyses de traçage d'isotopes stables d'atomes de carbone a révélé une production réduite d'aspartate dans les cellules déficientes pour CD73. Nous avons ensuite démontré que CD73 favorisait la croissance tumorale *in vivo* et la prolifération cellulaire *in vitro* en conditions limitantes en nutriments de façon dépendante de la production d'aspartate. L'aspartate production d'aspartate est relié de près à la respiration mitochondriale. À l'aide d'instruments d'analyseurs Seahorse, nous avons observé que CD73 favorisait la phosphorylation oxydative des cellules cancéreuses murines et humaines, de façon indépendante de l'adénosine. De façon consistante avec une respiration mitochondriale réduite, nous avons observé des niveaux réduits du cofacteur NAD⁺ dans les cellules déficientes pour CD73. Le nicotinamide riboside (NR) issue de la déphosphorylation du nicotinamide mononucléotide (NMN) est un précurseur de la biosynthèse du NAD⁺ via la voie de récupération. Nous avons démontré que les cellules tumorales produisaient

le NR de façon dépendante de l'expression de CD73. Puisque le NAD⁺ est utilisé comme substrat par les enzymes PARP, nous avons ensuite rapporté des niveaux diminués de PARylation et des niveaux augmentés de foci γ H2AX en réponse à la chimiothérapie dans les cellules déficientes pour CD73. Enfin, la supplémentation en NR normalise l'activité métabolique des cellules déficientes pour CD73. En bref, notre étude révèle un rôle précédemment inconnu de CD73 dans la régulation de l'amplitude métabolique des cellules cancéreuses et ouvre la porte à de nouvelles combinaison thérapeutiques potentielles.

5.2 Abstract

CD73 is an important immune checkpoint in tumor immunity through the production of immunosuppressive adenosine. Whether and how CD73 contributes to cancer progression beyond immunosuppression remains unclear. We investigated CD73's role in metabolic regulation of cancer cells by performing CRISPR-Cas9-mediated gene editing and by targeting CD73 with a monoclonal antibody (mAb). Stable isotope tracing analysis revealed significantly reduced cellular aspartate levels in CD73-deficient cells and we demonstrated that CD73 favors in vivo tumor growth and in vitro proliferation in nutrient-scarce conditions in an aspartate-dependent manner. Aspartate is closely linked to mitochondrial respiration. Mitochondrial stress test on Seahorse analyzers revealed that CD73 contributes to oxidative phosphorylation (oxphos), conserved across human and mouse cancer cell lines, independently from adenosine signaling. Concomitant with a suppressed oxphos, CD73-deficient cells displayed a significant reduction in NAD⁺ levels, an essential cofactor for mitochondrial respiration. NAD⁺ precursors include nicotinamide riboside (NR) through the NAD⁺ salvage pathway, which can be generated from extracellular nicotinamide mononucleotide (NMN). We demonstrated that human tumor cells produced extracellular NR in a CD73-dependent manner. As NAD⁺ is used as a substrate for PARP enzymes, we further report diminished PARylation and increased γ H2AX foci in response to chemotherapy in CD73-deficient cells. Ultimately, NR supplementation was able to normalize metabolic fitness of CD73-deficient tumor cells. Overall, our study reveals that CD73 significantly contributes to cancer cell metabolic fitness and support the study of metabolic therapeutics in combination with CD73-targeted blockade.

5.3 Introduction

The ecto-5'-nucleotidase CD73 is involved in the breakdown of extracellular ATP into adenosine by catalyzing the hydrolysis of adenosine monophosphate (AMP). Accumulation of adenosine favors cancer progression through its contribution to the creation of an immunosuppressed tumor microenvironment. In addition to inhibiting antitumor immune responses, CD73 and adenosine were found to promote metastasis, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and resistance to anticancer therapies, in part through non-immunosuppressive mechanisms which remain poorly understood (1). Not surprisingly, CD73 expression in human cancers is often found associated with a poor prognosis and several clinical trials are actively testing the targeted blockade of CD73 in many cancers, including the poorly responsive triple negative breast cancer subtype (TNBC) (1). Immunosuppression-independent roles of CD73 in promoting tumor growth are not completely understood thus far.

Cancer cells metabolism has gained much attention in the last decade for its central implication in cell proliferation and adaptation to hostile tumor microenvironments (2). While it was long thought that cancer cells shifted their metabolism from highly efficient ATP-producing oxidative phosphorylation (oxphos) to low ATP-yielding glycolysis despite presence of oxygen (e.g., Warburg effect), it is well accepted now that aerobic glycolysis does not predict for loss of oxidative metabolism in cancer cells. In fact, active mitochondrial metabolism promotes tumor cell invasiveness, metabolic adaptation, chemoresistance, survival of cancer-initiating cells and therapies aimed to interfere with mitochondrial metabolism has emerged as a potential therapeutic strategy (3-5). Mitochondrial metabolism is important to cancer cells via the catabolism and generation of ATP through oxphos and via the support of several vital biosynthesis pathways (e.g., 1C metabolism, anaplerosis, lipogenesis). Oxygen-requiring reactions also helps tumor cell proliferation beyond ATP production, via the generation of amino acids such as aspartate. For instance, a central role in sustaining proliferation for the ETC is to re-generate electron acceptors under the form of NAD⁺ required for aspartate biosynthesis (6, 7). The importance of aspartate in cancer cells' proliferation is exemplified by the observation that cancer cell lines able to import extracellular aspartate through expression of the glutamate-aspartate antiporter (SLC1A3) exhibits increased resistance to anti-proliferative activity of the ETC inhibition (8). Mitochondrial

respiration thus plays a pivotal role in sustaining cancer cells' proliferation through aspartate generation (9).

As opposed to de novo synthesis from tryptophan, NAD⁺ is primarily produced via salvage pathways that recycles precursors generated from NAD-consuming enzymes (10). Conversion of extracellular nicotinamide mononucleotide (NMN) to nicotinamide riboside (NR) is one way cells can salvage NAD⁺ biosynthesis. Accordingly, supplementing mice with NR or NMN enhances cellular NAD⁺ levels, promotes mitochondrial respiration and protects against metabolic stress (11-13). Extracellular NR is transported into cells by nucleoside transporters before being converted into NMN by nicotinamide riboside kinase-1 (NRK1) (14). In addition to local conversion from NMN through the activity of mitochondrial NMN adenylyltransferase 3 (NMNAT3), intact cytosolic NAD⁺ also contributes to mitochondrial pools of NAD⁺ via direct transport through MCART1 (SLC25A51) (15). NAMPT, a rate-limiting enzyme in NAD⁺ salvage pathway, has shown limited clinical therapeutic potential when inhibited. Interestingly, it was reported that CD73 inhibition could sensitize cancer cells to NAMPT inhibition in helping to downregulate NAD⁺ synthesis (16, 17). Mechanistically, several studies suggest that CD73 contribute to the salvage of NAD⁺ biosynthesis through extracellular conversion of NMN into NR (14, 18-20). In addition to its redox role, intracellular NAD⁺ is used as a substrate by a set of enzymes called poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) that cleave NAD⁺ into nicotinamide (NAM) and ADP-ribose (ADPR) in order to couple ADPR to acceptor proteins, a process known as PARylation (21, 22). While PARP inhibitors (PARPi) such as olaparib were initially used to induce synthetic lethality in BRCA1/2-deficient cancer cells, olaparib has shown therapeutic efficacy in BRCA1/2-efficient tumor as well (22, 23). Whether CD73 expression on cancer cells hinders PARPi efficiency is unknown but lowering NAD⁺ levels via NAMPT inhibition was shown to enhance olaparib therapeutic activity in TNBC cells (24).

While CD73 was shown to promote cancer in various ways, how CD73 contributes to cancer progression beyond immunosuppression isn't fully understood. Furthermore, the role of CD73 in the NAD⁺ salvage pathway and whether CD73 contributes to cancer cells' energetic regulation is largely unknown. Here we studied metabolic functions of CD73 in cancer cells and report that CD73-deficiency highlights an aspartate-dependent metabolic vulnerability which

impairs cancer cells' tumorigenicity in metabolically challenging conditions. We further demonstrate that extracellular CD73 contributes to intracellular NAD⁺ biosynthesis, cancer cells' metabolic fitness and PARP-dependent DNA-damage response. Finally, we provide a rationale for combining anti-CD73 therapy to PARP inhibitors.

5.4 Material and Methods

5.4.1 Cell cultures, CRISPR and plasmids transfection

MDA-MB-231 (MDA-231), 4T1, SM1 LWT1, PANC-1 cell lines were cultured in DMEM + 10% FBS. SK23MEL and HCC1954 cell lines were cultured in RPMI + 10% FBS. OV1369 and SKOV3 cell lines were cultured in OSE + 10% FBS + antibiotics. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were isolated from embryos at 13.5 days of gestation from WT and CD73^{-/-} C57Bl/6. MEFs were cultured in DMEM + 10% FBS and rapidly transformed within 7 days upon isolation with a lentiviral vector expressing an oncogenic K-Ras^{G12V} (pLenti PCK RasV12), kindly provided by Dr. Francis Rodier (Université de Montréal, Montréal, QC, CA) (25). Immortalized MEF clones upon K-Ras transformation were pooled and used for experimentation.

CD73 gene-editing was generated by transfection of CRISPR/Cas9 vector (px330, Addgene) expressing the 20mer target sequences GCAGCACGTTGGGTTCGGCG (exon1) and GACGCCGGCGACCAGTACCA (exon1), provided by Michael Hoelzel (University of Bonn, Germany). Cells were sorted based on CD73 expression (CD73⁺ and CD73⁻). Enzymatic functionality was verified using the commercially available malachite green kit assay (R&D system).

Empty vector (pLHCX-ev) and plasmid coding for a FLAG-tagged guinea pig asparaginase (pLHCX-gpASNase1) enzyme were kindly provided by Dr. Lucas B. Sullivan (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA) (26). CD73⁺ and CD73⁻ MDA-231 cells were infected with a retrovirus containing either pLHCX-ev or pLHCX-gpASNase1 and selected with 750µg/mL of Hygromycin B-containing media until all uninfected control cells died.

5.4.2 *Drugs and Reagents*

The following drugs/reagent were used; cell culture grade D-(+)-glucose (Sigma, #G7021), cell culture grade L-glutamine (Sigma, #G8540), blocking mouse anti-human CD73 monoclonal antibody clone 7G2 (Invitrogen, #410200), Adenosine 5'-(α,β -methylene)diphosphate (APCP; Sigma, #M3763), nicotinamide riboside (NR; Cayman Chemical, #23132), nicotinamide mononucleotide (NMN; Sigma, #N3501), recombinant human adenosine deaminase (rhADA; R&D systems, #7048-AD), recombinant human CD73 (rhCD73; R&D systems, #5795-EN), 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine (NECA; Tocris, #1691), SCH58261 (Tocris, #2270), PSB1115 (Tocris, #2009), olaparib (AZD2281; Selleckchem; #S1060). Doxorubicin and carboplatin were provided by the CRCHUM pharmacy.

5.4.3 *Animal experimentation*

2×10^6 MDA-MB-231 cells were injected sub-cutaneously in PBS 1X in immunodeficient NRG mice (Jackson Laboratory) and tumor growth was monitored thrice weekly. Tumor volume was measured by caliper in two dimensions, and volumes were estimated using the equation $V = (\text{large diameter} \times \text{small diameter}^2) \times 0.5$. Animals were housed at the CRCHUM and all experiments were performed in accordance with an Institutional Animal Care and Use Committee.

5.4.4 *Fluorescence Activated Cell Sorting*

Following fluorescence-conjugated antibodies were used for flow cytometry: anti-human CD73 BV421 (BD, #562430) and anti-mouse CD73 PE-Cy7 (eBioscience, #25-0731-82). For glucose analog incorporation assay, cells were incubated with 100 μM of 2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2-NBDG, Cayman Chemical, #11046) in glucose-free DMEM (10% FBS) for 30 minutes at 37°C before FACS acquisition. For mitochondrial ROS (superoxide anion) measurements, live cells were stained for 30 minutes at 37°C with 5 μM MitoSOX™ red probe (Thermofisher, #M36008) before FACS acquisition. For mitochondrial mass staining, cells were incubated with 25 μM of Mitotracker® green probe (Thermofisher, #M7514) at 37°C for 30 minutes before FACS acquisition. Cancer-stem like cells were sorted based on ALDH activity as previously described (27) using the Aldefluor kit (Stemcell, #01700). 0.05×10^6 freshly sorted ALDH^{hi} cells were seeded in seahorse XF24 plate and incubated overnight before seahorse analysis as described in following sections.

5.4.5 Cell proliferation assay in vitro

0.5x10⁴ cells were seeded in a 48-well plate and grown in complete media for 8-12h before being washed and switched to pyruvate-free and glucose- or glutamine-restricted media (Wisent, #319-062-CL). The moment at which the media was changed is defined as baseline. Percentage of well confluency was measured by applying a phase mask over 4X photos (2 photos per well) taken every 2h for 5 days using the Incucyte Zoom technology. Proliferation was calculated by reporting the confluence level every 0.5 days relative to confluence level at baseline for each well.

5.4.6 Isotope-labelled glucose & glutamine tracing

5x10⁴/cm² cells were cultured in glucose- or glutamine-free DMEM containing 10% dialyzed FCS (Wisent) and 25 mM U-[¹³C]-glucose (Cambridge Isotope Laboratories, #CLM-1396) or 4 mM U-[¹³C]-glutamine (Cambridge Isotope Laboratories, #CLM-1822) for 3h at 37°C. Metabolites were extracted from cells using dry ice-cold 80% methanol, followed by sonication (1x round of 10 min sonication, 30s on 30s off using an automatic sonicator) and removal of cellular debris by centrifugation at 4°C. Metabolite extracts were dried, derivatized as tert-butyltrimethylsilyl esters, and analyzed via GC-MS by the metabolomic core from the *Goodman cancer research centre* (McGill University). Metabolite abundance was expressed relative to the internal standard D27 (D-myristic acid) and normalized to cell number. Mass isotopomer distribution was determined using a custom algorithm developed at McGill University.

5.4.7 Genome-wide transcriptional analysis

RNA was isolated using QIAgen RNeasy mini kit and quantified using nanodrop. Samples were sent to *Génomique Québec* (Montréal, QC, CA) for gene expression analysis using an Affymetrix microarray chip. Expression values were computed using the robust multi-array analysis (RMA) normalization method ('affy' package in Bioconductor) (28, 29). When multiple probe sets mapped to the same official gene symbol, we computed their average value. Differential expression (DE) analysis was performed using 'limma' (30) standard analysis pipeline. Significant DE gene were defined as genes with absolute fold-change ≥ 1.5 and adjusted P-value ≤ 0.05 . Statistical analyses were performed between *NT5E* mRNA expression and genes expression using Spearman correlation.

5.4.8 Seahorse Assay

Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were measured in real-time using the Seahorse (XF24 and XFe96) technology (Agilent). Cells were seeded and incubated in a 37°C/CO₂ incubator for 12h or 48h. Drugs were added to the media and changed after 24h with fresh media. The day of the assay, cells were washed and incubated for 60 min in a non-CO₂ incubator in seahorse assay base media (Agilent, #103334-100) containing 25mM glucose (Sigma, #G7021) and 2 mM Glutamine (Sigma, #G8540). For glycolysis measurement, cells were glucose-starved for 60 minutes. Assay injection drugs comprised serial combinations of either glucose (25 mM), oligomycin (1 μM; Sigma, #04876), carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP; 1 μM; Sigma, #C2920), rotenone (1 μM; Sigma, #R8875) and antimycin (0.1 μM; Sigma, #A8674). Data were normalized by cell counts (XF24) or seeding density (crystal violet; XFe96).

5.4.9 Measurements of intracellular metabolites

3x10⁶ cells were seeded in 10 cm petri dishes. Cell were incubated with drugs for 48h in pyruvate-free media supplemented with 25 mM glucose, 2 mM Glutamax and 10% dialyzed FCS. Media was washed once with PBS 1X, remove completely and cell culture dishes were quickly snap frozen on liquid nitrogen. Cells were scraped on ice and collected in 675 μL ice-cold extraction buffer [80% (vol/vol) methanol, 2 mM ammonium acetate, pH 9.0, with 10 μM AMP-13C10,15N5 (IS-AMP) as internal standard], transferred into polypropylene (PP) tubes, and sonicated in a cup-horn sonicator at 150 W for 2 min (cycles of 10s on, 10s off) in an ethanol/ice bath. Cell extracts were centrifuged at 4°C for 10 min at 25,830 × g, and supernatants were collected in ice-cold 2-mL PP tubes, to which 250 μL water was added. Polar metabolites were extracted with 1,080 μL of chloroform:heptane (3:1 vol/vol) by 2 × 10s vortex followed by 10-min incubation on ice and 15-min centrifugation at 4°C, 12,500 × g. From the upper phase, 600 μL was collected without carrying out any interface material and transferred into new cold 2-mL PP tubes. These tubes were centrifuged again, and 400 μL supernatant were collected into cold 1.5-mL PP tubes. Samples were frozen in liquid nitrogen and dried in two steps – first, in a SpeedVac Concentrator for ~2 h (maximal vacuum, no heat; Savant) at 4°C to remove methanol; and second, by lyophilization for 90 min (Labconco FreeZone) – and then stored at -80°C until used. Samples were reconstituted in 14 μL of Milli-Q water, and injections of 3 μL were performed

in duplicate on an electrospray ionization LC-MS/MS system composed of an Agilent 1200 SL device (for LC) and a triple-quadrupole mass spectrometer (4000Q TRAP MS/MS; Sciex). Samples were separated by gradient elution of 12 min on a Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 75-mm, 2.7- μ m column (Agilent Technologies) using mobile phase consisting of an aqueous solvent A (10 mM tributylamine, 15 mM acetic acid, pH 5.2) and an organic solvent B [95% (vol/vol) acetonitrile in water, 0.1% formic acid], at a flow rate of 0.75 mL/min and column oven temperature of 40°C. Quantification was performed as described in (31).

5.4.10 Measurements of metabolites in supernatant

0.2 μ g/mL of human recombinant CD73 or 0.05×10⁶ cells seeded in a 96-wells plate were exposed to 0.2 mM of exogenous NMN for 15, 30 and 60 minutes. 40% methanol+40% acetonitrile dry ice-cold extraction solution was added to samples to reach a 2:2:1 methanol:acetonitrile:aqueous ratio. Samples were flash frozen on dry ice and stored at -80°C. Alternatively, cells were washed and incubated in assay buffer (2 mM MgCl₂, 125 mM NaCl, 1 mM KCl, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES pH 7.2, ddH₂O) without addition of exogenous NMN and supernatant was collected and centrifuged at different timepoint as previously. When applicable, experimental drugs were added to assay buffer. Supernatant was analyzed for selected metabolites by LC-MS. Depending on the experiment, results are shown as area of peak obtain by mass spectrometry analysis or absolute concentrations normalized on protein content. For LC-MS/MS analysis, samples (500 μ L) were thawed and AMP-13C10,15N5 (IS-AMP) added as internal standard. Samples were incubated 1h at 4°C with vigorous agitation and centrifuged 10 min, 20K × g, 4°C. Supernatants were transferred to new polypropylene tubes, dried down at 10°C by centrifugal vacuum evaporation, then reconstituted in 50 μ L 80% acetonitrile in water before LC-MS/MS analysis. Samples (5 μ L injections) were separated by HILIC (Nexera X2, Shimadzu) at 0.25 mL/min using a gradient elution (A=MilliQ water, B=90% acetonitrile in water, both A and B containing 10mM ammonium acetate pH 9.0 and 5 μ M Agilent's deactivator additive; gradient: 0 min 90% B, 2 min 90% B, 12 min 60% B, 15 min 60% B, 16 min 90% B (re-equilibration), 24 min 90% B) on a Poroshell 120 HILIC-Z 2.1 × 100 mm, 2.7 μ m HPLC column (Agilent) following a guard column of similar material, both kept at 30°C. Metabolites were detected after ESI on a triple quadrupole mass spectrometer (QTRAP 6500, SCIEX) with polarity switching looking for the following transitions: negative ions IS-AMP 360.8/79.0, NAD

661.8/540.0; positive ions NR 255.0/123.1, NMN 334.9/123.2. For quantification, a mix of pure standards prepared in 80% acetonitrile in water was used to build a calibration curve.

5.4.11 Complex I enzyme activity assay

Electron transport chain NADH-dehydrogenase activity was measured using a commercially available colorimetric assay kit (Abcam, #ab109721). Briefly, 1×10^7 cells were harvested and washed in PBS 1X. Protein concentration was quantified by standard Bradford assay on a small aliquot of each sample. Remaining samples were diluted with PBS to a final 5.5 mg/mL concentration. Samples were processed and tests performed according to the manufacturer protocol.

5.4.12 Western Blot

Adherent cells were washed with ice-cold PBS and lysed and scrapped in CelLytic™ M buffer (Sigma, #C2978) with 1X Halt™ protease and phosphatase cocktail inhibitors (ThermoFisher, #78440) before being centrifuged for 15 min at 20,000g at 4°C. Proteins were harvested from supernatant and quantified by using Bradford protein assay dye reagent (Bio-Rad, #500-0006). 25 µg of protein from whole cell extract were loaded in 4-10% acrylamide gels and transferred on nitrocellulose membranes. Membranes were stained overnight in 5% BSA-containing PBS Tween 0.1% with following antibodies: mouse anti-β-actin (1:5000; Abcam, #ab8226), mouse anti-PLCγ (1:2000; Millipore, #05-163), mouse anti-CD73 (1:1000; Abcam, #Ab91086), rabbit anti-PGC1α (1:2500; Novus Biologicals, #NBP1-04676), rabbit anti-NRF1 (1:2000; Cell Signaling, #46743), rabbit anti-TFAM (1:2000; Abcam, #ab131607) and mouse anti-FLAG (1:1000; Sigma, #F7425). For PARylation assay, cells were seeded in 6-well plates and drugs was added in media for 48h. Before proceeding to protein extraction, cells were treated with 2 mM H₂O₂ for 20 minutes at room temperature. 50µg proteins were load in a 4-10% acrylamide gels, transferred on nitrocellulose membrane and stained overnight in 5% milk-containing PBS Tween 0.1% with mouse anti-PAR (1:1000; Trevigen, #4335-MC-100). Proteins were revealed with fluorescent secondary anti-rabbit or anti-mouse (1:10 000; LI-COR) antibodies using the LI-COR fluorescent scanner or by chemiluminescence using HRP-conjugated secondary anti-mouse antibody (2.5:10 000; Milipore, #AP124P) and Amersham ECL prime detection reagent (GE healthcare lifescience, #RPN2232).

5.4.13 Immunofluorescence

Cells were seeded on glass slides and incubated overnight before adding treatments. 48h later, cells were fixed with formalin 10% for 10 min at room temperature, washed with PBS 1X and then permeabilized with 0.25% Triton-X100 in PBS 1X for 15 min. Slides were blocked 1h and incubated overnight at 4 °C with anti-phospho-H2AX (1:2000; Millipore, #05-636). Cells were then washed 3 times with PBS 1X Tween 0.05% followed by incubation with the secondary antibody. The glass slides were stained with DAPI, washed and mounted with fluoromount (Sigma; #F4680).

5.4.14 Statistical Analysis

Student T tests were performed when comparing 2 conditions. 1-way ANOVA was used when comparing 3 or more conditions. Statistical significance is shown in comparison to the control condition (untreated or CD73+), unless indicated otherwise by a bracket. All statistical analyses were performed using graph pad prism software (version 9.0.2).

5.5 Results

5.5.1 CD73 favors tumor growth independently of its immunosuppressive function

Using CRISPR-Cas9 conjugated with fluorescence activated cell sorting (FACS) in the human TNBC cell line MDA-231, we engineered a stable CD73-negative cell line (Fig S5.1A) that displayed complete loss of CD73 protein expression (Fig S5.1B) and activity (Fig S5.1C) as measured by western blot and malachite green assay respectively. When inoculated subcutaneously in immunodeficient (NRG) mice, MDA-231 cells lacking CD73 expression were found to yield significantly smaller tumors *in vivo* (Fig 5.1A). *In vitro*, CD73's impact on cell proliferation was assessed using Incucyte live imaging (Fig S5.1D-F). In conditions of excess abundance of both glucose (25 mM) and glutamine (2 mM), CD73+ and CD73- cells proliferated equally (Fig 5.1B). To better recapitulate *in vivo* nutrient-limiting conditions found within tumor microenvironments, we next compared *in vitro* proliferation in reduced amount of either glucose or glutamine, both essential carbon source to fuel energetic requirements for proliferation. Since pyruvate is an intermediate metabolite produced during glycolysis that can feed mitochondrial metabolism, assays were performed in pyruvate-free media. In both glutamine- (0 – 0.1 mM) and glucose- (0 – 2.5 mM) limiting conditions, CD73-negative cells displayed reduced proliferation

compared to CD73-positive cells (Fig 5.1B & S5.1D-F). To verify whether CD73-deficient had impaired nutrient consumption, we next measured incorporation of a fluorescent glucose analog (2-NDBG) and a stable isotope tracer for glutamine (U-[¹³C]-glutamine) by FACS and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) respectively. We found no difference between CD73-expressing and non-expressing cells in incorporation of either 2-NDBG (Fig 5.1C) or M+5 labeled-glutamine (Fig 5.1D), thus ruling out the hypothesis that CD73-deficient cells proliferate less in metabolically challenging conditions because of reduced nutrient uptake. Overall, these results suggest that CD73 promotes MDA-231 tumor growth, independently from its immunosuppressive role, in growth-limiting conditions.

5.5.2 *CD73 enhances intracellular aspartate synthesis to fuel tumor growth*

To better understand how CD73 regulates metabolic fitness downstream of glucose or glutamine uptake, we next investigated metabolomic processing of both nutrients in vitro through stable isotope tracer analysis (SITA). We did not find any major differences in the distribution of intermediate metabolites labeling between CD73-positive and CD73-negative cells cultured with either carbon-labeled glucose (U-[¹³C]-glucose) or glutamine (U-[¹³C]-glutamine), indicating that MDA-231 cells process both glucose and glutamine independently from CD73 expression (Fig S5.2A-B). Relative abundance of most intermediate metabolites was also not found to be significantly different between CD73-positive and negative cells (Fig S5.2C-D). Surprisingly, however, aspartate levels, to which glucose and glutamine contribute largely (Fig 5.1E), were found reduced in CD73-deficient cells of about 50% compared to CD73-expressing cells (Fig 5.1F).

Because aspartate is central to protein and nucleotide synthesis and is thus described as a limiting metabolite for tumor growth (7), we next investigated whether aspartate supplementation restored proliferation of CD73-deficient cells. Mammalian cells uptake extracellular aspartate when expressing the glutamate-aspartate antiporter SLC1A3. A previous study reported that MDA-231 cells only express low levels of SCL1A3 (31). Given that asparagine that is more readily incorporated by mammalian cells and is found at higher levels in circulation than aspartate (32), we used a strategy previously developed by Sullivan et al. (25). Briefly, we introduced an enzyme with an asparaginase activity (gpASNase1) that converts asparagine into aspartate to restore pools

of intracellular aspartate upon exposure to exogenous asparagine in CD73-deficient MDA-231 cells (Fig 5.1G). FLAG-tagged gpASNase1 expression was confirmed by western blot (Fig 5.1H). Expectedly, when exposed to 1 mM of exogenous asparagine for 24h, cells expressing the gpASNase1 enzyme, but not empty vector (ev)-transfected CD73-deficient cells displayed an increase in intracellular aspartate content as measured by LC-MS (Fig 5.1I). In glutamine-restricted conditions (0.1mM) in vitro, both CD73-expressing ev- and gpASNase1-transfected cells displayed enhanced proliferation compared to CD73-deficient cells (Fig 5.1J). 1mM of exogenous asparagine rescued proliferation of gpASNase1-expressing, but not ev-transfected CD73-deficient cells in vitro (Fig 5.1J). Similarly, when inoculated in immunodeficient NRG mice, tumor growth was rescued in CD73-deficient tumors expressing gpASNase1 (Fig 5.1K). Altogether, these results indicate that CD73 promotes MDA-231 tumor growth through enhanced aspartate biosynthesis downstream of glucose and glutamine processing.

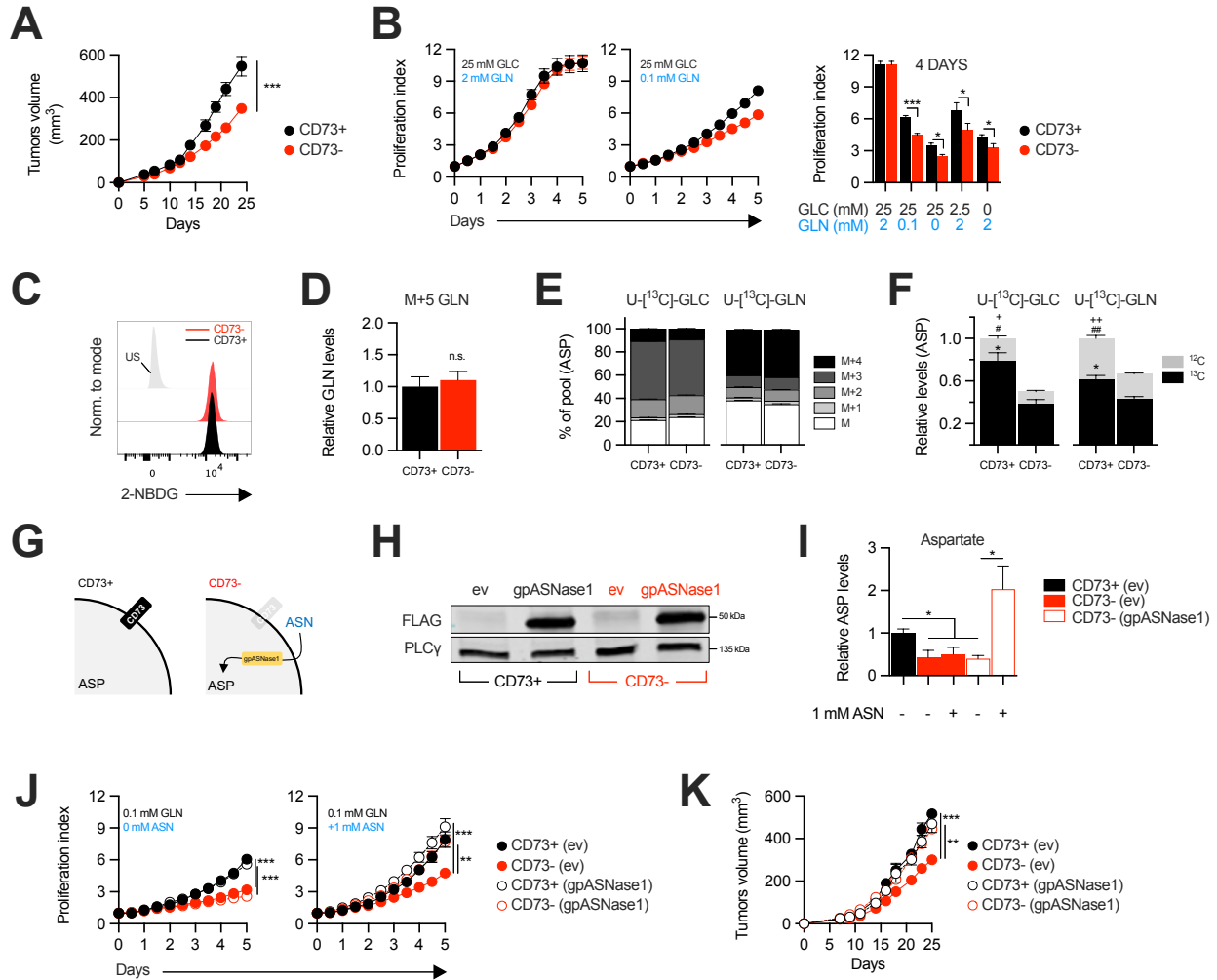


Figure 5.1 – CD73 promotes tumor growth independently from immune suppression through aspartate biosynthesis. **A** Sub-cutaneous tumor growth of CD73+ and CD73- MDA-231 tumors in immune-deficient NRG mice. Results shows combined data of 2 independent experiments cumulating 15 mice per groups. **B** In vitro proliferation of CD73+ and CD73- MDA-231 cells was analyzed by Incucyte live imaging technology in presence of excess or restricted conditions of glucose (GLC) and glutamine (GLN). Data from representative proliferation curves (left panels) and pooled (n=3 experiments per conditions) quantification of proliferation after 4 days of culture (right panel) are shown. **C** FACS analysis of in vitro incorporation of a fluorescent glucose analog (2-NBDG) in CD73+ and CD73- MDA-231 cells (n=3). **D** GC-MS analysis of in vitro incorporation a stable isotopically labeled glutamine tracer in vitro (U-[¹³C]-GLN). M+5 glutamine (GLN) levels were normalized on cell numbers and are shown relative to CD73+ cells (n=1). **E** Incorporation of isotopically labeled glucose (U-[¹³C]-GLC; left panel) or glutamine (U-[¹³C]-GLN; right panel) into aspartate (ASP) compared between CD73+ and CD73- MDA-231 cells. **F** SITA analysis of glucose (left panel) and glutamine (right panel) contribution to ASP intracellular biosynthesis. ASP levels were normalized on cell number and are shown relative to CD73+ cells. Stats: *comparison of ¹³C levels; #Comparison of ¹²C levels; +Comparison of total ¹³C+¹²C levels. **G** Schematic representation of gpASNase1-mediated rescue of ASP biosynthesis in CD73- cells exposed to exogenous asparagine (ASN). **H** Western blot of CD73+ and CD73- MDA-231 cells expressing empty vector (ev) or FLAG-tagged gpASNase1. PLCγ is shown as a loading control. **I** Intracellular ASP levels measured in cells expressing or not (ev) the gpASNase1 upon exposure to exogenous ASN (1mM) for 24h. ASP levels were normalized on cell number and are shown relative to CD73+ (ev) cells (n=1). **J** In vitro proliferation of gpASNase1-expressing and non-expressing (ev) MDA-231 in presence (right panel) or not (left panel) of exogenous ASN (pooled data from 2 experiments). **K** In vivo tumor growth of 2×10⁶ gpASNase1-expressing or not (ev) CD73+ and CD73- MDA-231 cells in NRG mice. Means +/- SEM are shown (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 by 2-tailed unpaired Student T tests).

5.5.3 *CD73 regulates metabolic fitness of cancer cells in an adenosine-independent manner*

To understand how CD73 regulates aspartate biosynthesis, we performed genome-wide transcriptional analysis of MDA-231 cells expressing CD73 or not. Aspartate is generated from oxaloacetate through enzymatic transamination carried by the mitochondrial enzyme GOT2 or by cytosolic GOT1 when the ETC is inhibited or impaired (9). Transcriptional analysis revealed GOT1 and GOT2 not to be differentially regulated in CD73 expressing and non-expressing cells and therefore cannot account for reduced aspartate synthesis in CD73-deficient cells (Fig S5.2E). In fact, consistent with SITA analyses (Fig S5.2A-B) no TCA cycle enzymes were found to be differentially regulated (Fig S5.2E), therefore suggesting a functional rather than transcriptional dysregulation of aspartate biosynthesis in CD73-deficient cells.

Next, since mitochondrial respiration is important for aspartate biosynthesis, we investigated metabolic profiling of various cancer cells using Seahorse (Agilent) technology that measures both oxygen consumption rate (OCR) and milieu's acidification rate (ECAR) which reflect oxphos and glycolytic metabolism respectively (Fig 5.2A). We found that CD73-deficiency altered oxphos metabolism of MDA-231 cells (Fig 5.2B). While glycolysis was not affected by CD73 expression, CD73-deficient cells also displayed reduced glycolytic reserve as defined by the maximal glycolytic capacity upon oxphos inhibition (Fig 5.2C). Importantly, treating CD73-expressing MDA-231 cells with a specific monoclonal antibody targeting human CD73 (clone 7G2; (34)) produced similar metabolic alterations (Fig 5.2B-C). In addition to MDA-231 cells, we generated two other CRISPR-mediated CD73-deficient mouse cancer cell lines (Fig S5.3A) and found that CD73 expression also positively regulated metabolism of 4T1 and SM1 LWT1 cell lines (Fig 5.2D-E). Because CD73 was also reported to be an important marker for tumorigenicity of certain cancer stem cell (CSC) population (35, 36) and that CSC mainly rely on oxphos metabolism to maintain their tumorigenic functions (37), we then purified CSC-like MDA-231 cells based on ALDH activity (Fig S5.3B). Again, CD73-deficient ALDH^{hi} CSC-like MDA-231 cells presented altered oxphos metabolism and glycolytic reserve (Fig 5.2D-E). Next, we derived MEFs from WT and CD73^{-/-} C57Bl/6 mice and transformed them with an oncogenic K-Ras protein (G12V) (Fig S5.3C-D) and observed that CD73-knockout MEF K-Ras displayed reduced metabolic fitness as well (Fig 5.2F). Finally, we treated a panel of CD73-expressing human cancer cell lines (Fig 5.2G) with the anti-CD73 monoclonal antibody 7G2 for 48h and observed that anti-

CD73 therapy can reciprocate metabolic vulnerability observed in CD73-deficient cancer cells (Fig 5.2H).

CD73-generated adenosine mediates signaling through activation of G-coupled protein receptors (1). MDA-231 cells principally express adenosine receptors A2b (38), but A2a is the adenosine high-affinity receptor (1). Treatment with either A2b (PSB1115; 10 μ M) or A2a (SCH58261; 10 μ M) inhibitors for 48h did not affect metabolic fitness of CD73-expressing cells (Fig 5.2I). Addition of human recombinant adenosine deaminase (rhADA; 1 μ g/mL) to readily deplete adenosine in culture supernatant also did not produce a significant effect, suggesting that adenosine does not regulate metabolism of MDA-231 cells either extra- or intracellularly (Fig 5.2I). Consistently, exposure to adenosine (ADO) or the pan-adenosine receptors agonist NECA also did not significantly enhance either mitochondrial oxphos or glycolytic reserve of CD73-deficient MDA-231 cells (Fig 5.2J). Overall, these results suggest that CD73 contributes to metabolic fitness of cancer cells, but not through adenosine production.

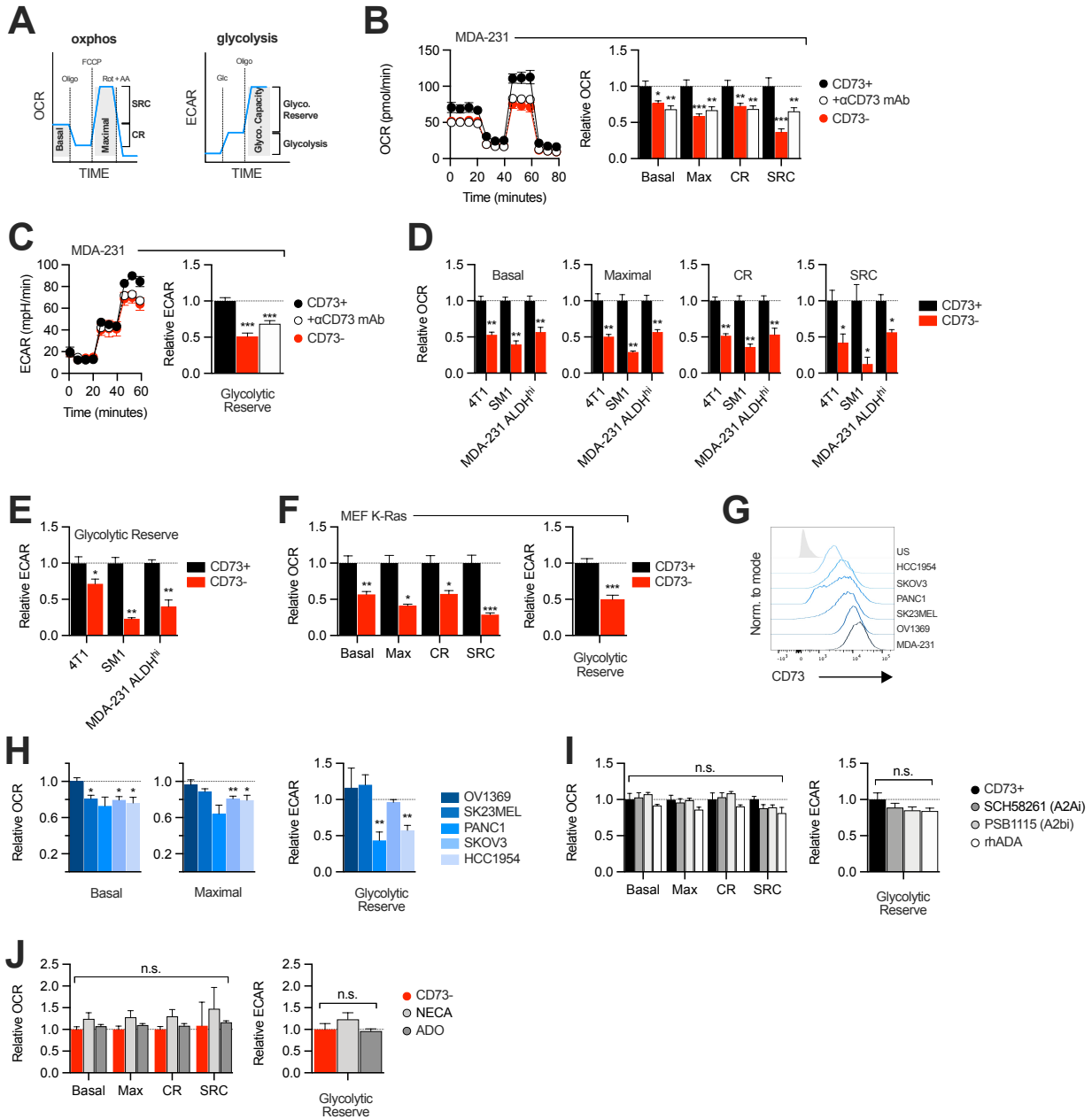


Figure 5.2 – CD73 regulates metabolic fitness of cancer cells independently from adenosine signaling. **A** Schematized metabolic profiling and parameters obtained from Seahorse mito stress test and glycolysis test. OXPHOS and glycolytic parameters were calculated according to Agilent calculator tool. **B** OXPHOS profile (left panel) and parameters (right panel) of CD73+ (+/- 1 μ g/mL anti-CD73 mAb 7G2 for 48h) and CD73- MDA-231 cells. OXPHOS parameters are shown relative to CD73+ cells from pooled (n=3) experiments. **C** Glycolytic profile (left panel) and glycolytic reserve (right panel) of CD73+ (+/- 1 μ g/mL anti-CD73 mAb 7G2 for 48h) and CD73- MDA-231 cells. Glycolytic reserve is shown relative to CD73+ cells from pooled (n=3) experiments. **D-E** OXPHOS parameters (**D**) and glycolytic reserve (**E**) compared between various CD73-expressing and CRISPR-based CD73-deficient cell lines. ALDH^{hi} cells were sorted from MDA-231 cells using the Aldefluor kit. Data are shown relative to CD73+ cells (MDA-231 ALDH^{hi} n=1, 4T1 and SM1 LWT1 n=2). **F** OXPHOS parameters (left panel) and glycolytic reserve (right panel) compared between WT and CD73^{-/-} primary MEF transformed with an oncogenic K-Ras. Data are shown relative to WT cells (n=2). **G** CD73 expression profile on various human cancer cell lines analyzed by FACS. US=unstained control. **H** OXPHOS parameters (left and middle panels) and glycolytic reserve (right panel) of anti-CD73 mAb (7G2)-

treated cells compared to untreated cells. Data are shown relative to respective untreated cells (n=1 per cell line). **I** Oxphos parameters (left panel) and glycolytic reserve (right panel) of A2ai- or A2bi- or rhADA- treated CD73+ MDA-231 cells. Data are shown relative to untreated CD73+ cells (A2ai and A2bi n=2, rhADA n=1). **J** Oxphos parameters (left panel) and glycolytic reserve (right panel) of NECA- or ADO- treated CD73- MDA-231 cells. Data are shown relative to untreated CD73- cells (NECA n=2, ADO n=1). Means +/- SEM are shown (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 by 2-tailed unpaired Student T tests).

5.5.4 *CD73-deficiency does not impair mitochondrial biogenesis*

An essential role of mitochondrial respiration in supporting tumor growth of cancer cells is the biosynthesis of aspartate through the activity of the ETC (7-9). Aspartate can also fuel mitochondrial oxphos through its role in shuttling electrons to the ETC as knockout of either component of the malate-aspartate shuttle, SLC1A3 or SLC25A10 transporters, impairs oxphos metabolism of MDA-231 cells (39). Consistent with reduced oxphos metabolism, CD73-deficient and anti-CD73-treated MDA-231 cells also displayed reduced ATP to ADP/AMP ratios (Fig 5.3A) and reduced MitoSOX™ staining (Fig 5.3B). MitoSOX™ stains for superoxide (O₂⁻) which is the primary ROS produced by the activity of the ETC. Accordingly, low dose of metformin, a mitochondrial oxphos inhibitor, was previously shown to reduce MitoSOX™ staining in MDA-231 cells (40). We next investigated mitochondrial biogenesis in MDA-231 cells. Western blot and FACS analyses revealed no difference in the expression of regulators involved in mitochondrial biogenesis (PGC1 α , TFAM or NRF1) (Fig 5.3C) or in mitochondrial mass (Fig 5.3D) between CD73-expressing and non-expressing cells. Consistently, we found no transcriptional dysregulation of any of the subunits required for the assembly of the ETC complexes (Fig 5.3E) and using a commercial kit to measure the enzymatic NADH-dehydrogenase activity of the complex I, we observed no intrinsic dysfunction or complex assembly deficiency in CD73-negative cells (Fig 5.3F). Furthermore, we found no difference in intracellular ratio of oxidized NAD⁺ to reduced NADH analyzed by LC-MS (Fig 5.3G). Altogether, these results suggest that CD73 regulates mitochondrial respiration independently from mitochondrial biogenesis and that CD73-deficient MDA-231 cells have a functional ETC.

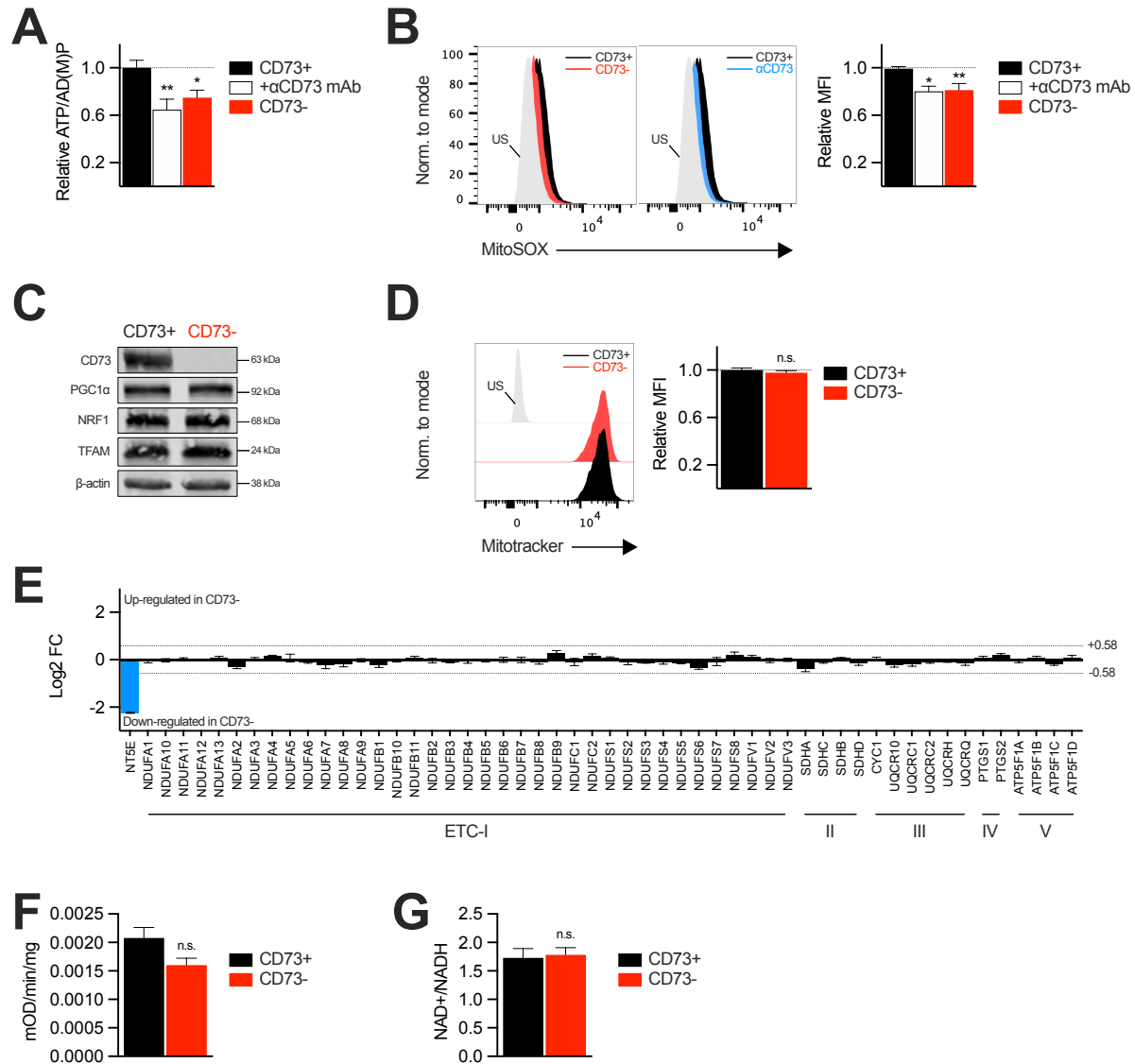


Figure 5.3 – Mitochondrial biogenesis is not impaired in CD73-deficient cells. **A** LC-MS analysis of total intracellular levels of ATP, ADP and AMP. Data show combined ratios of ATP:ADP and ATP:AMP in CD73+ (+/- 1µg/mL anti-CD73 mAb 7G2 for 48h) and CD73- MDA-231 cells. Data are shown relative to CD73+ cells from pooled (n=2) experiments. **B** MitoSOX® staining (left panel) of CD73+ (+/- 1µg/mL anti-CD73 mAb 7G2 for 48h) or CD73- MDA-231 cells. Data show mean fluorescence intensity (MFI; right panel) relative to CD73+ cells from pooled (n=3) experiments. **C** Western blot showing levels of PGC1α, NRF1 and TFAM in CD73+ and CD73- MDA-231 cells. β-Actin is used as a loading control (n=3). **D** Mitotracker green staining (left panel) of CD73+ and CD73- MDA-231 cells. Data show mean fluorescence intensity (MFI; right panel) relative to CD73+ cells (n=3). **E** Transcriptional analysis by microarray of electron transport chain (ETC) complexes showing gene regulation (Log₂ of fold change; FC) in CD73- compared to CD73+ MDA-231 cells. Dashed lines show threshold of 1.5-fold change (+/-0.58 Log₂ of FC). CD73 (NT5E; blue bar) is shown as an internal control (n=1). **F** NADH-dehydrogenase enzymatic activity of immobilized ETC complex I isolated from CD73+ and CD73- MDA-231 cells in presence of exogenous NADH. Enzymatic activity is reported as change in absorbance per minute per mg of protein (n=3). **G** Intracellular ratio of oxidized (NAD⁺) to reduced (NADH) nicotinamide adenine dinucleotide measured by LC-MS in CD73+ and CD73- MDA-231 cells (n=3). Means +/- SEM are shown (*p<0.05; **p<0.01 by 2-tailed unpaired Student T tests).

5.5.5 *CD73 contributes to cancer cells' metabolism through NAD⁺ salvage pathway*

Because nicotinamide riboside (NR) was identified as an extracellular source for intracellular NAD⁺ biogenesis (14, 18, 41) and that NAD⁺ plays a central role in redox reactions required for mitochondrial respiration, we next sought to validate CD73 implication in the NAD⁺ salvage pathway. Since CD73 was suggested to hydrolyze nicotinamide mononucleotide (NMN) into NR (14, 16, 17, 19, 20), we measured NR levels in culture supernatants by LC-MS as described elsewhere (42). We first tested recombinant human CD73 protein and adherent MDA-231 cells exposed to exogenous NMN and measured increasing levels of NR within 60 minutes in presence of non-inhibited CD73 only (Fig S5.4A-B). We next tested whether MDA-231 cells endogenously produced NR *in vitro* by collecting supernatant from confluent adherent cells cultured in a nicotinamide- (NAD⁺, NMN, NR) and serum-free physiological buffer. While no traces of NAD⁺, NMN and NR were found in the physiological buffer, all were measurable in supernatants of cultured cells and cells deficient for CD73 failed to accumulate NR (Fig 5.4A-C). To support the hypothesis that CD73 contributes to NAD⁺ salvage pathway, we next measured total intracellular content of both oxidized and reduced NAD⁺/H in MDA-231 cells expressing CD73 or not, exposed to anti-CD73 mAb therapy or NR for 48h. Consistent with a role for NR as a precursor for NAD⁺ biosynthesis, we found reduced levels of both NAD⁺ and NADH in cells inhibited or deficient for CD73 and increased levels in CD73-deficient cells supplemented with NR (Fig 5.4D). Further corroborating an adenosine-independent mechanism of action, adenosine depletion with rhADA did not significantly alter NAD⁺/H content of CD73-efficient cultures (Fig 5.4D). Altogether, these results suggest that CD73 extracellularly contributes to NR production and intracellular NAD⁺/H biosynthesis through NAD⁺ salvage pathway.

Finally, we tested the hypothesis that CD73 contributes to cancer cells' metabolism via the NAD⁺ salvage pathway. When exposed to exogenous NR for 48h, CD73-deficient cells displayed increased oxygen consumption (Fig 5.4E) and glycolytic reserve (Fig 5.4F). Ultimately, because NAD⁺ is required for aspartate biosynthesis, we also found increased intracellular aspartate levels in NR-supplemented CD73-deficient, whereas aspartate production decreased in anti-CD73 7G2 mAb-treated CD73-efficient MDA-231 cells, again in an adenosine-independent (rhADA) manner (Fig 5.4G). Altogether, these results suggest that CD73-generated extracellular NR contribution to intracellular NAD⁺/H biosynthesis helps regulate cancer cells' metabolic pathways.

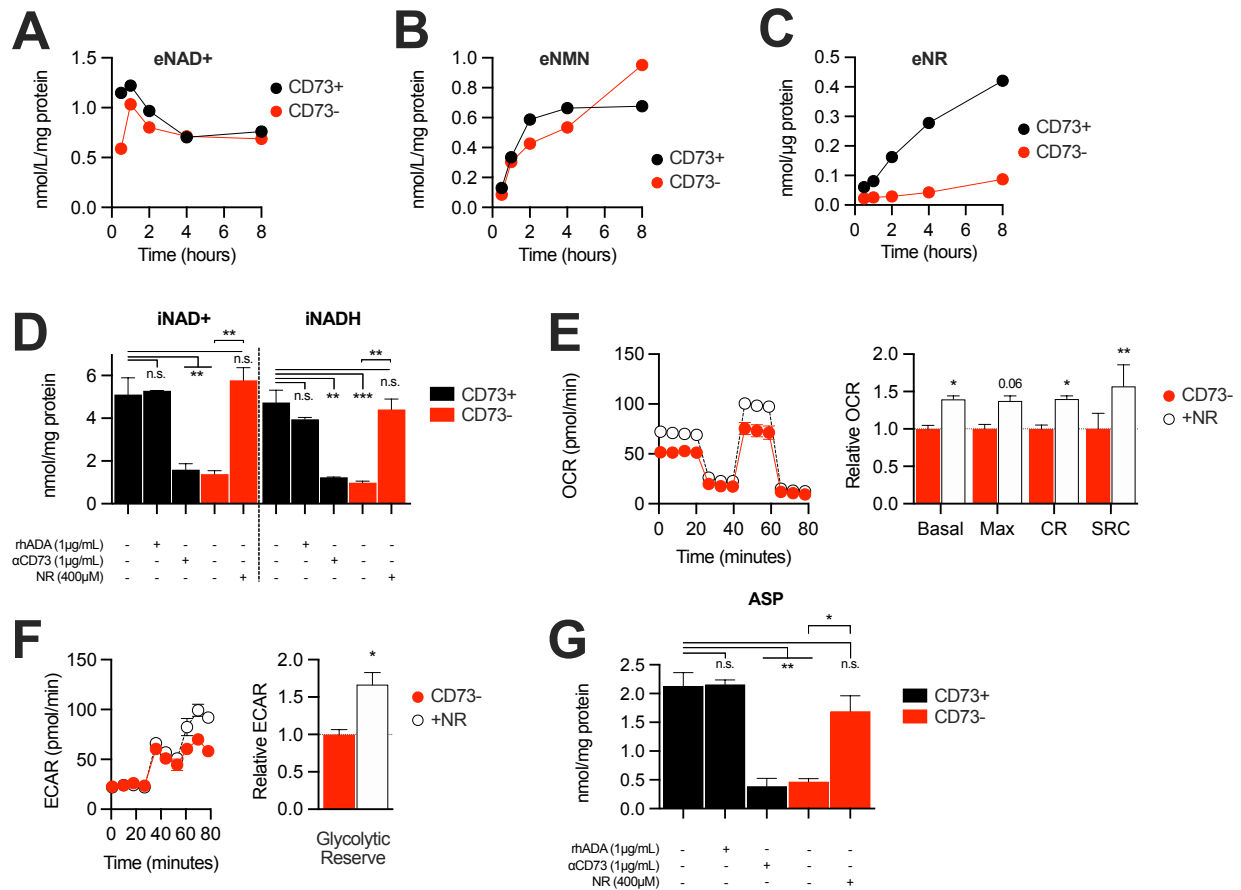


Figure 5.4 – CD73 regulates cancer cells' metabolic fitness through the NAD⁺ salvage pathway. A-C LC-MS analysis of extracellular NAD⁺ (A), NMN (B) and NR (C) endogenous production (0.5-8h) in supernatant of CD73⁺ and CD73⁻ MDA-231 cells cultured in nicotinamide (NAD⁺, NMN, NR, NAM)-free buffer. Levels were normalized on protein content of adherent cells (n=2). D LC-MS analysis of intracellular oxidized (iNAD⁺) and reduced (iNADH) nicotinamide adenine levels normalized to protein content of CD73⁺ (+/-1 μg/mL αCD73 mAb or 1 μg/mL rhADA for 48h) and CD73⁻ (+/-100 μM NR supplemented 2x per day for 48h) MDA-231 cells (n=2). E Oxygen consumption (OCR) profile (left panel) and oXphos parameters (right panel) of CD73⁻ MDA-231 cells cultured with 400 μM NR for 48h (n=3). F Extracellular acidification (ECAR) profile (left panel) and glycolytic reserve (right panel) of CD73⁻ MDA-231 cells cultured with 400 μM NR for 48h (n=3). G LC-MS analysis of intracellular aspartate (ASP) levels normalized to protein content of CD73⁺ (+/-1 μg/mL αCD73 mAb or 1 μg/mL rhADA for 48h) and CD73⁻ (+/-100 μM NR supplemented 2x per day for 48h) MDA-231 cells (n=2). Means +/- SEM are shown (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 by 1-way ANOVA (D, G) or 2-tailed unpaired Student T tests (E-F & D-G; CD73⁻ +/- NR)).

5.5.6 CD73-deficiency sensitizes cancer cells to DNA-damaging agents in a PARP-dependent manner

To corroborate our observations of decreased intracellular NAD⁺ in CD73-deficient cells, we next measured PAR chains by western blot in H₂O₂-treated MDA-231 cells. Consistently, we observed diminished levels of PARylation in CD73-deficient cells (Fig 5.5A). Decreased PARylation could not account for decreased PARPs expression since transcriptional analysis revealed no dysregulation of PARPs in CD73-deficient cells (Fig 5.5B). We then measured

unresolved DNA-damage via γ H2AX staining in response to chemotherapeutics and olaparib, a PARP inhibitor. Interestingly, increasing doses of olaparib alone sufficed to induce γ H2AX foci accumulation only in MDA-231 cells deficient for CD73 (Fig 5.5C). Similarly, CD73-deficient cells were more sensitive to doxorubicin and carboplatin (Fig 5.5D). Combining carboplatin to olaparib further accentuated unresolved DNA-damage (Fig 5.5D). Kinetics of γ H2AX accumulation upon olaparib and carboplatin treatment suggested that CD73-expressing cells resolved most DNA-damage after 48h of exposure (Fig S5.5). Since targeting CD73 with 7G2 mAb reduced and NR supplementation increased PARylation levels in CD73-expressing and non-expressing cells respectively (Fig 5.5E-F), we next measured unresolved DNA-damage upon treatment with 1.25 μ M olaparib and 0.5 μ M carboplatin for 48h. In CD73-expressing cells, targeted blockade of CD73 sensitized cells to combined olaparib and carboplatin treatment whereas NR supplementation partially resolved DNA-damage in treated CD73-deficient cells (Fig 5.5G). Altogether, these results suggest that CD73 contributes to DNA-damage response in a PARP-dependent manner.

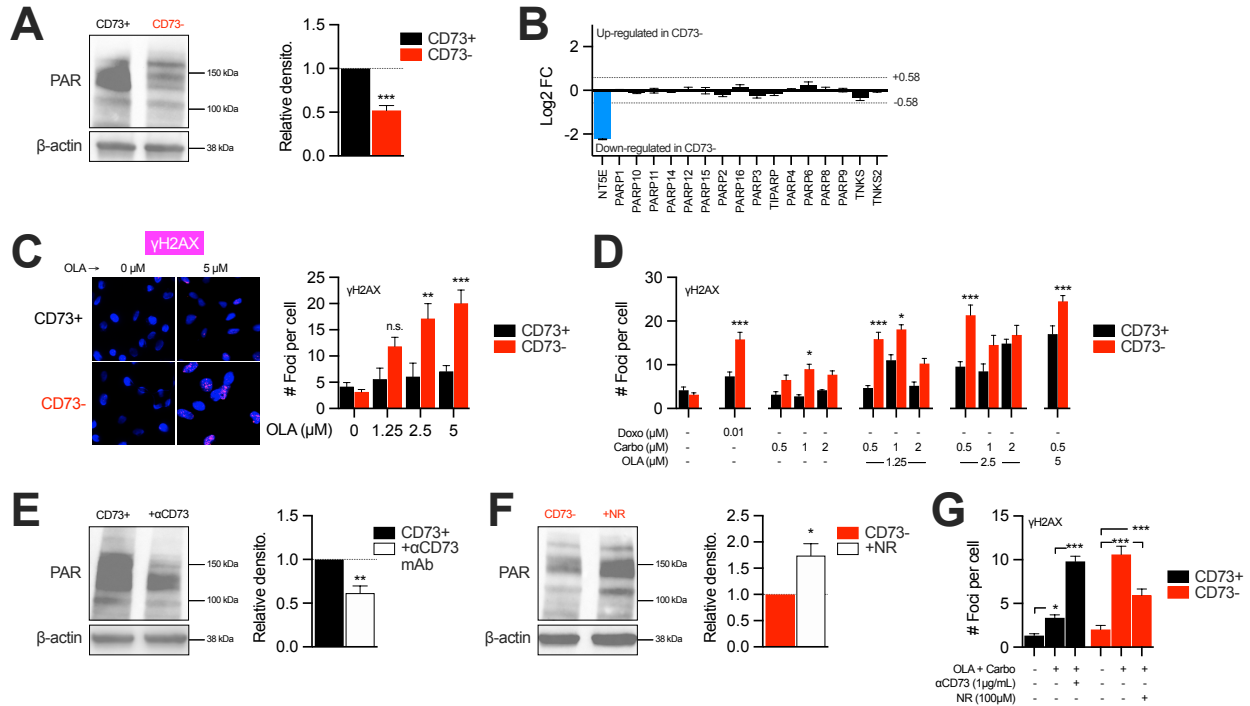


Figure 5.5 – CD73 contributes to PARP-dependent DNA-damage repair in response to chemotherapy. A Western blot (left panel) showing PARylation levels in CD73+ and CD73- MDA-231 cells. Densitometry (right panel) is shown relative to CD73+ cells from pooled (n=5) experiments. **B** Transcriptional analysis by microarray of PARP enzymes showing gene regulation (Log₂ of fold change; FC) in CD73- cells compared to CD73+ MDA-231 cells. Dashed lines show threshold of 1.5-fold change (+/-0.58 Log₂ of FC). CD73 (NT5E; blue bar) is shown as an internal control (n=1). **C** γ H2AX staining of CD73+ and CD73- MDA-231 cells treated with olaparib (0-5 μ M) for 48h. Left panels show representative images for γ H2AX (magenta) and DAPI (blue) staining. Data show number of γ H2AX foci per cells (right panel) from pooled (n=2) experiments. **D** Number of γ H2AX foci per CD73+ and CD73- MDA-231 cells treated with doxorubicin (0.01 μ M) or carboplatin (0.5-2 μ M) with or without olaparib (1.25-5 μ M) for 48h. Data from 1 representative experiment are shown (n=2). **E** Western blot (left panel) showing PARylation levels in CD73+ MDA-231 cells treated with α CD73 mAb (1 μ g/mL; clone 7G2; 48h). Densitometry (right panel) is shown relative to untreated CD73+ cells from pooled (n=2) experiments. **F** Western blot (left panel) showing PARylation levels in CD73- MDA-231 cells treated with NR (100 μ M; 48h). Densitometry (right panel) is shown relative to untreated CD73- cells from pooled (n=2) experiments. **G** Number of γ H2AX foci per CD73+ and CD73- MDA-231 cells treated with 1.25 μ M olaparib + 0.5 μ M carboplatin for 48h with or without α CD73 mAb (1 μ g/mL) or NR (100 μ M). Data show # of foci from pooled (n=2) experiments. Means +/- SEM are shown (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 by 2-tailed unpaired Student T tests).

5.6 Discussion

TNBC has the worst prognosis of breast cancer subtypes. CD73 expression was found associated with anthracycline-resistance and was identified as a therapeutic target in TNBC (43). In MDA-231 cancer cells, a TNBC cell line expressing high levels of surface CD73, CD73-targeted blockade strongly impairs tumor growth in immune-incompetent mice (44-46). How CD73 promotes tumor growth independently from its immunosuppressive effect is nonetheless unclear. Here, we report that CD73-deficiency impairs tumor growth in vivo, but not in vitro when

cultured in complete media, therefore suggesting a microenvironment-dependent tumor promoting role for CD73. Common growth culture media, designed to support rapid cell proliferation rather than to imitate physiological conditions, fail to capture the real composition of the tumoral microenvironment *in vivo*, in which cells are metabolically challenged. Glucose and glutamine, both essential nutrients used as carbon sources to fuel energetic requirements of cancer cells, are limited in tumor microenvironment (47, 48). Hence, we further report that proliferation is better sustained in nutrient-scarce conditions for MDA-231 cells expressing CD73 therefore suggesting that CD73-deficiency highlights a metabolic vulnerability that is likely to curb tumor growth *in vivo*. By using stable isotope tracers, we further found a dysregulated production of aspartate, a growth-limiting metabolite (26), in CD73-deficient cells. Ultimately, we report that impaired tumor growth of CD73-deficient MDA-231 cells is restored upon rescue of aspartate synthesis through synthetic expression of gpASNase1 that converts asparagine into aspartate.

Targeting mitochondrial respiration is actively pursued as anti-cancer therapy. Large cohort transcriptional metabolic profiling revealed that both the TCA cycle and oxphos pathways are highly upregulated in cancer cells across many tumor types, including breast cancer, compared to both normal and stromal tissue (49). Indeed, mitochondrial respiration is primordial for efficient proliferation in low glucose conditions (48). Oxphos metabolism, driven by the ETC activity, is intrinsically linked to the TCA cycle fed by glucose and glutamine notably. The complex I of the ETC helps aspartate biosynthesis by regenerating NAD⁺, an electron acceptor (6, 7). Metformin and phenformin, both biguanides that inhibits ETC complex I, were found to diminish intracellular aspartate and cell proliferation (6, 8, 9, 50). Metformin-mediated inhibition of tumor growth is lost upon expression of the metformin-resistant *Saccharomyces cerevisiae* single-subunit NDI1, that oxidizes NADH similarly to complex I of the mammalian ETC but without proton pumping (51), further strengthening a role for mitochondrial respiration in sustaining cell proliferation relying on aspartate generation rather than ATP production. Here we used Seahorse technology as a mean to quantify oxphos metabolism of cancer cells *in vitro* and report that cells lacking CD73 expression displayed a reduced mitochondrial respiration, consistent with reduced aspartate production. Because our genome-wide transcriptional analysis did not suggest any intrinsic defect in ETC assembly, we reasoned that CD73 was involved in a functional regulation of mitochondrial respiration. Adenosine, which is generated from CD73-mediated extracellular AMP hydrolysis,

modulate adenylyl cyclase activity and cyclic AMP through 4 different GPCRs. Interestingly, forskolin-mediated cAMP-PKA activation was reported to enhance mitochondrial fusion in K-Ras-transformed NIH3T3 cells (52). Also, a cAMP analog was found to drive PGC1 α -dependent mitochondrial biogenesis in glioblastoma cells (53). Surprisingly, we did not observe dysregulated PGC1 α signaling in CD73-deficient cells. By using a pan-adenosine receptor agonist (NECA) to surrogate adenosine signaling in CD73-deficient cells and recombinant adenosine deaminase (rhADA) or inhibitors of adenosine-mediated cAMP signaling (SCH58261 and PSB1115) in CD73-competent cells, we were able to exclude adenosine as the main driver of CD73-mediated regulation of mitochondrial respiration in MDA-231 cells. However, while we couldn't link adenosine signaling to metabolic regulation in vitro, it's worth noting that the adenosinergic axis, through cAMP-promoted mitochondrial biogenesis, was found to positively regulate oxphos in acute myeloid leukemia where CD39 is adaptively associated with cytarabine-resistance (54). Conversely, A2a-signaling was shown to impair metabolic fitness of CD8 T cells upon in vitro activation (55).

In search of alternative pathways possibly regulating cancer cells' metabolism, we investigated the role of CD73 in the NAD⁺ salvage pathway. Using LC-MS analysis supported by PARylation assays, we observed that CD73-deficiency was associated with reduced intracellular NAD⁺ pools. As suggested (18), NR supplementation helped restore intracellular NAD⁺ biosynthesis in CD73-deficient cells, further strengthening the role of CD73 in NAD⁺ salvage pathway in MDA-231 cells. Our findings corroborate reports that suggest that CD73 expression circumvents NAMPT requirement for NAD⁺ biosynthesis (16, 17). On the other hand, the hydrolyzing activity of CD73 on NMN was disputed in a recent study where CD73-deficiency in MCF-7 cells did not suffice to impair NAD⁺-dependent DNA-damage repair complexes (56). Thus, CD73 might harbor different importance in NAD⁺ salvage pathway in various cell type. As such, another study reported that CD73 was required for NMN conversion into NR on endothelial cells to protect aortic rings from angiotensin II-induced dysfunction (20). Consistently, here we found CD73 as a limiting enzyme responsible for NR production extracellularly in MDA-231 cultures.

Intracellular NAD⁺ is essential for many energetic pathways and other physiological processes such as DNA-repair (21). Oxidoreductive enzymatic reactions requiring NAD⁺ are not only necessary for mitochondrial respiration and aspartate production but also during glycolysis (57, 58). Oligomycin-mediated ATP synthase inhibition hence forces cells to rather convert pyruvate into lactate so to regenerate NAD⁺ required for glycolysis, which defines the glycolytic reserve. Our findings regarding reduced intracellular NAD⁺ are in accordance with a role for CD73 in regulating both cancer cells' metabolism and DNA-damage response. On the one hand, in addition to reduced oxphos metabolism, CD73-deficient cells also displayed impaired glycolytic capacity. On the other hand, consistent with diminished PARP activity, CD73-deficient cells exposed to DNA-damaging agents displayed increased γ H2AX foci. While others have reported that A2b signaling reduces γ H2AX and 53BP1 foci in cancer cells upon γ -irradiation (59), we here found that CD73 also helps resolve DNA-damage in a PARP-dependent manner since NR supplementation partially prevents γ H2AX foci accumulation in chemotherapy-treated CD73-deficient cells. It is possible, however, that both CD73-mediated A2b signaling and NAD⁺ biosynthesis positively regulates DNA-damage resolution in cancer cells. Tumors mutated for BRCA1 or deficient in DNA-repair (HRD) are more sensitive to PARPi due to the accumulation of DNA damage (22). In BRCA1-efficient MDA-231 tumor cells, while olaparib had little effect on DNA-damage in parental CD73-expressing cells, we found that the absence of CD73 sufficed to yield accumulating unresolved γ H2AX foci with doses as low as 1.25 μ M olaparib. Our findings are thus consistent with increased antitumor activity of PARP inhibition when NAD⁺ levels are reduced in TNBC (24) and thus provide a rationale for combining CD73 inhibitors to PARP inhibitors.

Importantly we observed a conserved role for CD73 in promoting metabolic fitness in other settings and cancer cell lines, suggesting a preserved role for CD73 in NAD⁺ salvage pathway across various contexts. Interestingly, we observed CD73-mediated metabolic flexibility to be maintained in ALDH^{hi} CSC-like MDA-231 cells. CD73 was shown to promote stemness and in vivo tumorigenicity of ALDH^{hi} pancreatic neuroendocrine (35) and Rho^{hi} renal CSC (36). Cancer stem cells exhibit unique metabolic flexibility and rely mainly on oxphos metabolism to sustain stemness properties (60). Whether CD73 promotes CSC tumorigenicity through metabolic regulation was not the focus of this study and remains unknown. Altogether, with the observation

of enhanced aspartate biosynthesis, our study supports a model where CD73 promotes tumor growth by, at least, positively regulating mitochondrial respiration that may be relevant across multiple cancer types. Whether enhanced maximal glycolytic capacity also contributes to enhanced tumor growth of CD73-expressing cell was not investigated in this study. We however postulate that CD73's contribution to cancer cells' general metabolic fitness is likely to grant multiple pro-tumorigenic advantages *in vivo*.

Finally, our findings may also apply to other cell types such as immune cells. For instance, lowering NAD⁺ levels in Tregs enhances tumor immune control in mice (61). Interestingly, glucose-avid (2-NBDG^{hi}) FoxP3⁺ Tregs, which display reduced suppressive functionality, express lower levels of CD73 compared to 2-NBDG^{lo} suppressive Tregs (62). While CD73-deficient Tregs are less efficient than WT Tregs in suppressing conventional CD4 T cells proliferation *in vitro* and are highly inefficient in promoting tumor growth in mice (63), it's unclear whether adenosine production is entirely responsible for CD73-mediated suppressive activity of Tregs. Moreover, restoring NAD⁺ biosynthesis through NR supplementation was found to rescue survival of metabolically impaired Tregs and to prevent mitochondrial fitness decline of CD8 T cells (61, 64). Intriguingly, one study found CD73 expression to associate with increased functionality of CD8 T cells in AML patients (65). Whether and how CD73 regulates metabolism of other cell types such as immune cells is unknown and should be the focus of future studies.

In conclusion, our study reports that CD73 promotes metabolic flexibility of cancer cells through NAD⁺ salvage pathway which offers new therapeutic opportunities that can be explored in combination with CD73 targeted blockade (Fig 5.6).

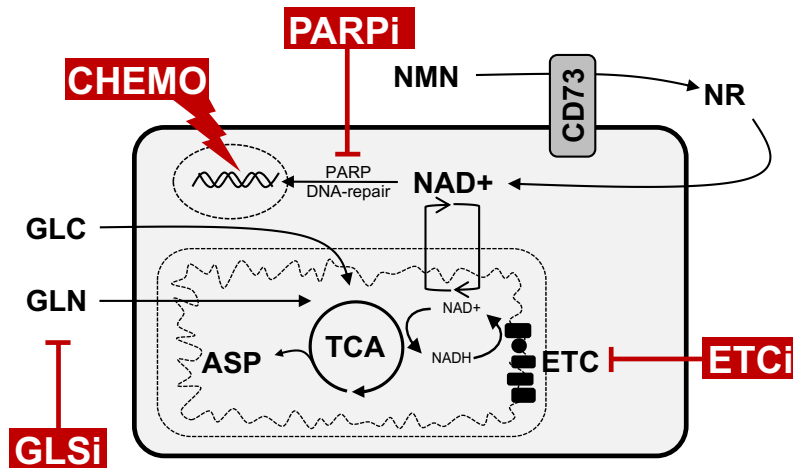


Figure 5.6 – CD73 promotes metabolic fitness of cancer cells. Schematic representation of how CD73 regulates cancer cells' metabolism. CD73's implication to NAD⁺ salvage pathway contributes to NAD⁺ biosynthesis and metabolic fitness of cancer cells. Increased NAD⁺ helps mitochondrial respiration-mediated production of aspartate (ASP) and PARP-mediated DNA-damage response and repair. Our finding supports the postulate that DNA-damage response- (i.e. PARP inhibitors, chemotherapeutic agents) and metabolism- targeting drugs (i.e. GLSi and ETCi) could benefit from combined inhibition of CD73.

5.7 Acknowledgments

The authors thank Julien Lamontagne, Alexia Grangeon, Dominique Gauchat, Daina Avizonis and Bozena Samborska for technical assistance. DA received a scholarship from FRQS.

5.8 References

1. Allard B, Allard D, Buisseret L, Stagg J. Publisher Correction: The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(10):650.
2. Martinez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(10):669-80.
3. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(11):2482-90.
4. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(10):992-1003, 1-15.
5. Dar S, Chhina J, Mert I, Chitale D, Bueckers T, Kaur H, et al. Bioenergetic Adaptations in Chemoresistant Ovarian Cancer Cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):8760.
6. Gui DY, Sullivan LB, Luengo A, Hosios AM, Bush LN, Gitego N, et al. Environment Dictates Dependence on Mitochondrial Complex I for NAD⁺ and Aspartate Production and Determines Cancer Cell Sensitivity to Metformin. *Cell Metab*. 2016;24(5):716-27.
7. Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM, Bush LN, Freinkman E, Vander Heiden MG. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell*. 2015;162(3):552-63.
8. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, Zhu XG, Fidelin J, Sviderskiy VO, et al. Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat Cell Biol*. 2018;20(7):775-81.
9. Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell*. 2015;162(3):540-51.
10. Verdin E. NAD(+) in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*. 2015;350(6265):1208-13.
11. Ryu D, Zhang H, Ropelle ER, Sorrentino V, Mazala DA, Mouchiroud L, et al. NAD⁺ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global PARylation. *Sci Transl Med*. 2016;8(361):361ra139.
12. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab*. 2011;14(4):528-36.
13. Sims CA, Guan Y, Mukherjee S, Singh K, Botolin P, Davila A, Jr., et al. Nicotinamide mononucleotide preserves mitochondrial function and increases survival in hemorrhagic shock. *JCI Insight*. 2018;3(17).
14. Ratajczak J, Joffraud M, Trammell SA, Ras R, Canela N, Boutant M, et al. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nat Commun*. 2016;7:13103.
15. Kory N, Uit de Bos J, van der Rijt S, Jankovic N, Gura M, Arp N, et al. MCART1/SLC25A51 is required for mitochondrial NAD transport. *Sci Adv*. 2020;6(43).
16. Grozio A, Sociali G, Sturla L, Caffa I, Soncini D, Salis A, et al. CD73 protein as a source of extracellular precursors for sustained NAD⁺ biosynthesis in FK866-treated tumor cells. *J Biol Chem*. 2013;288(36):25938-49.
17. Sociali G, Raffaghello L, Magnone M, Zamporlini F, Emionite L, Sturla L, et al. Antitumor effect of combined NAMPT and CD73 inhibition in an ovarian cancer model. *Oncotarget*. 2016;7(3):2968-84.
18. Nikiforov A, Dolle C, Niere M, Ziegler M. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J Biol Chem*. 2011;286(24):21767-78.
19. Kulikova V, Shabalin K, Nerinovski K, Dolle C, Niere M, Yakimov A, et al. Generation, Release, and Uptake of the NAD Precursor Nicotinic Acid Riboside by Human Cells. *J Biol Chem*. 2015;290(45):27124-37.
20. Mateuszuk L, Campagna R, Kutryb-Zajac B, Kus K, Slominska EM, Smolenski RT, et al. Reversal of endothelial dysfunction by nicotinamide mononucleotide via extracellular conversion to nicotinamide riboside. *Biochem Pharmacol*. 2020;178:114019.
21. Navas LE, Carnero A. NAD(+) metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):2.
22. Pommier Y, O'Connor MJ, de Bono J. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med*. 2016;8(362):362ps17.
23. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(8):852-61.
24. Bajrami I, Kigozi A, Van Weverwijk A, Brough R, Frankum J, Lord CJ, et al. Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2012;4(10):1087-96.
25. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009;11(8):973-9.

26. Sullivan LB, Luengo A, Danai LV, Bush LN, Diehl FF, Hosios AM, et al. Aspartate is an endogenous metabolic limitation for tumour growth. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):782-8.
27. Lee KM, Giltneane JM, Balko JM, Schwarz LJ, Guerrero-Zotano AL, Hutchinson KE, et al. MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab.* 2017;26(4):633-47 e7.
28. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003;4(2):249-64.
29. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics.* 2004;20(3):307-15.
30. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
31. Guay C, Joly E, Pepin E, Barbeau A, Hentsch L, Pineda M, et al. A role for cytosolic isocitrate dehydrogenase as a negative regulator of glucose signaling for insulin secretion in pancreatic ss-cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e77097.
32. Sun J, Nagel R, Zaal EA, Ugalde AP, Han R, Proost N, et al. SLC1A3 contributes to L-asparaginase resistance in solid tumors. *EMBO J.* 2019;38(21):e102147.
33. Mayers JR, Vander Heiden MG. Famine versus feast: understanding the metabolism of tumors in vivo. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(3):130-40.
34. Hausler SF, Del Barrio IM, Diessner J, Stein RG, Strohschein J, Honig A, et al. Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion. *Am J Transl Res.* 2014;6(2):129-39.
35. Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Shimada S, Akiyama Y, Aihara A, et al. CD73 as a therapeutic target for pancreatic neuroendocrine tumor stem cells. *Int J Oncol.* 2016;48(2):657-69.
36. Song L, Ye W, Cui Y, Lu J, Zhang Y, Ding N, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is a biomarker for clear cell renal carcinoma stem-like cells. *Oncotarget.* 2017;8(19):31977-92.
37. Snyder V, Reed-Newman TC, Arnold L, Thomas SM, Anant S. Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets. *Front Oncol.* 2018;8:203.
38. Fernandez-Gallardo M, Gonzalez-Ramirez R, Sandoval A, Felix R, Monjaraz E. Adenosine Stimulate Proliferation and Migration in Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167445.
39. Cheng CT, Qi Y, Wang YC, Chi KK, Chung Y, Ouyang C, et al. Arginine starvation kills tumor cells through aspartate exhaustion and mitochondrial dysfunction. *Commun Biol.* 2018;1:178.
40. Schexnayder C, Broussard K, Onuaguluchi D, Poche A, Ismail M, McAtee L, et al. Metformin Inhibits Migration and Invasion by Suppressing ROS Production and COX2 Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).
41. Canto C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y, et al. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.* 2012;15(6):838-47.
42. Camacho-Pereira J, Tarrago MG, Chini CCS, Nin V, Escande C, Warner GM, et al. CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab.* 2016;23(6):1127-39.
43. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(27):11091-6.
44. Zhou X, Zhi X, Zhou P, Chen S, Zhao F, Shao Z, et al. Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2007;17(6):1341-6.
45. Zhi X, Wang Y, Zhou X, Yu J, Jian R, Tang S, et al. RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2010;101(12):2561-9.
46. Rust S, Guillard S, Sachsenmeier K, Hay C, Davidson M, Karlsson A, et al. Combining phenotypic and proteomic approaches to identify membrane targets in a 'triple negative' breast cancer cell type. *Mol Cancer.* 2013;12:11.
47. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vazquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D608-D17.
48. Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, Yucel B, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature.* 2014;508(7494):108-12.
49. Rohatgi N, Ghoshdastider U, Baruah P, Skanderup AJ. A pan-cancer metabolic atlas of the tumor microenvironment. *bioRxiv.* 2020:2020.10.16.342519.
50. Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(29):10574-9.

51. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*. 2014;3:e02242.
52. Palorini R, De Rasio D, Gaviraghi M, Sala Danna L, Signorile A, Cirulli C, et al. Oncogenic K-ras expression is associated with derangement of the cAMP/PKA pathway and forskolin-reversible alterations of mitochondrial dynamics and respiration. *Oncogene*. 2013;32(3):352-62.
53. Xing F, Luan Y, Cai J, Wu S, Mai J, Gu J, et al. The Anti-Warburg Effect Elicited by the cAMP-PGC1alpha Pathway Drives Differentiation of Glioblastoma Cells into Astrocytes. *Cell Rep*. 2018;23(9):2832-3.
54. Aroua N, Boet E, Ghisi M, Nicolau-Travers ML, Saland E, Gwilliam R, et al. Extracellular ATP and CD39 Activate cAMP-Mediated Mitochondrial Stress Response to Promote Cytarabine Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*. 2020;10(10):1544-65.
55. Mastelic-Gavillet B, Navarro Rodrigo B, Decombaz L, Wang H, Ercolano G, Ahmed R, et al. Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8(+) T cells. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):257.
56. Wilk A, Hayat F, Cunningham R, Li J, Garavaglia S, Zamani L, et al. Extracellular NAD(+) enhances PARP-dependent DNA repair capacity independently of CD73 activity. *Sci Rep*. 2020;10(1):651.
57. Hopp AK, Gruter P, Hottiger MO. Regulation of Glucose Metabolism by NAD(+) and ADP-Ribosylation. *Cells*. 2019;8(8).
58. Luengo A, Li Z, Gui DY, Sullivan LB, Zagorulya M, Do BT, et al. Increased demand for NAD(+) relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Mol Cell*. 2021;81(4):691-707 e6.
59. Kitabatake K, Kaji T, Tsukimoto M. Involvement of CD73 and A2B Receptor in Radiation-Induced DNA Damage Response and Cell Migration in Human Glioblastoma A172 Cells. *Biol Pharm Bull*. 2021;44(2):197-210.
60. De Francesco EM, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cells (CSCs): metabolic strategies for their identification and eradication. *Biochem J*. 2018;475(9):1611-34.
61. Wang H, Franco F, Tsui YC, Xie X, Trefny MP, Zappasodi R, et al. CD36-mediated metabolic adaptation supports regulatory T cell survival and function in tumors. *Nat Immunol*. 2020;21(3):298-308.
62. Watson MJ, Vignali PDA, Mullett SJ, Overacre-Delgoffe AE, Peralta RM, Grebinoski S, et al. Metabolic support of tumour-infiltrating regulatory T cells by lactic acid. *Nature*. 2021;591(7851):645-51.
63. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res*. 2011;71(8):2892-900.
64. Yu YR, Imrichova H, Wang H, Chao T, Xiao Z, Gao M, et al. Disturbed mitochondrial dynamics in CD8(+) TILs reinforce T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2020;21(12):1540-51.
65. Kong Y, Jia B, Zhao C, Claxton DF, Sharma A, Annageldiyev C, et al. Downregulation of CD73 associates with T cell exhaustion in AML patients. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):40.

5.9 Supplementary figures

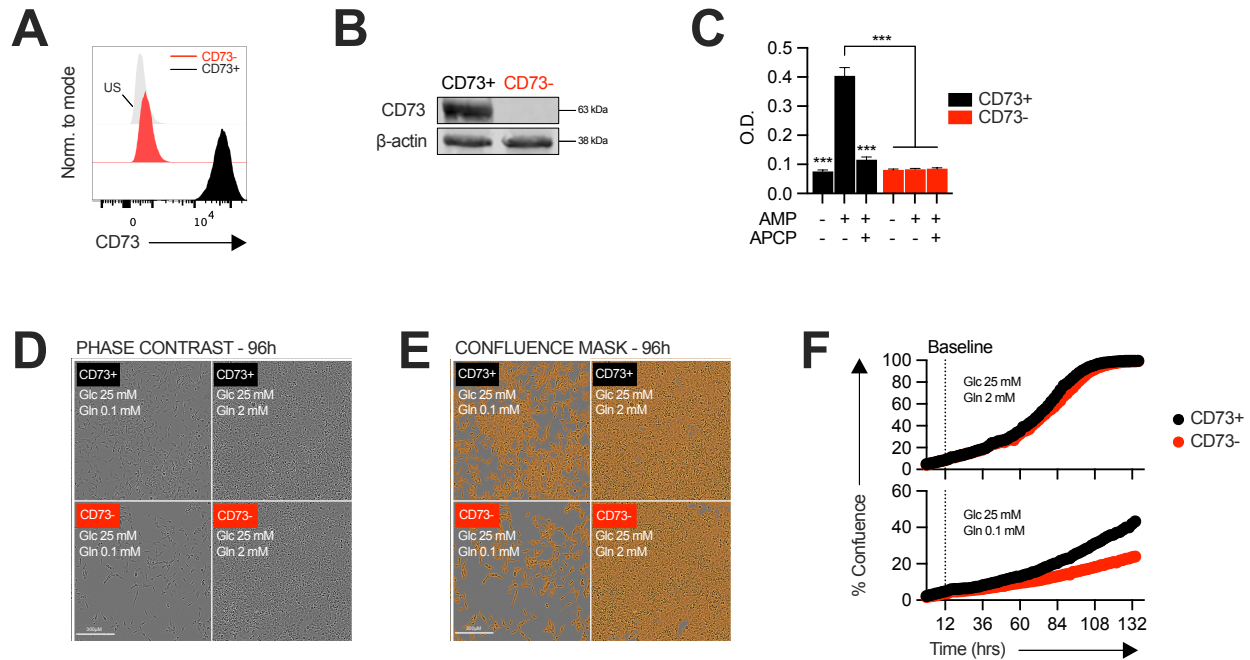


Figure S5.1 – CD73 knockout efficiency and analysis of proliferation assay using Incucyte live imaging technology. **A-C** Knockout efficiency of CD73 on MDA-231 cells following CRISPR-Cas9 gene edition. Cell sorting enrichment was confirmed by cell surface (**A**; FACS. US=unstained control) and total (**B**; western blot) CD73 expression. **C** Analysis of CD73 hydrolyzing enzymatic activity compared between CD73+ and CD73- cultures. APCP=CD73 inhibitor. **D-E** Examples of in vitro proliferation imaging in presence of excess (2 mM) or limited (0.1 mM) amount of glutamine (Gln) measured using Incucyte technology. Proliferation was quantified by measuring confluence level at different timepoints. **D** Phase contrast representative images of CD73+ and CD73- cultures 72h after initiation of assay. **E** Same images (as in **D**) with a confluence mask applied. **F** Percentage of well confluence over time (0-5 days). Cells were seeded in regular complete media for 8-12h before being switched to assay media (excess or limited Gln), which is defined as baseline confluence (dashed line). Proliferation index (**Fig 1D**) is expressed as a ratio of increased confluence every 0.5 days relative to baseline. Means +/- SEM are shown (***) $p < 0.001$ by Student T tests).

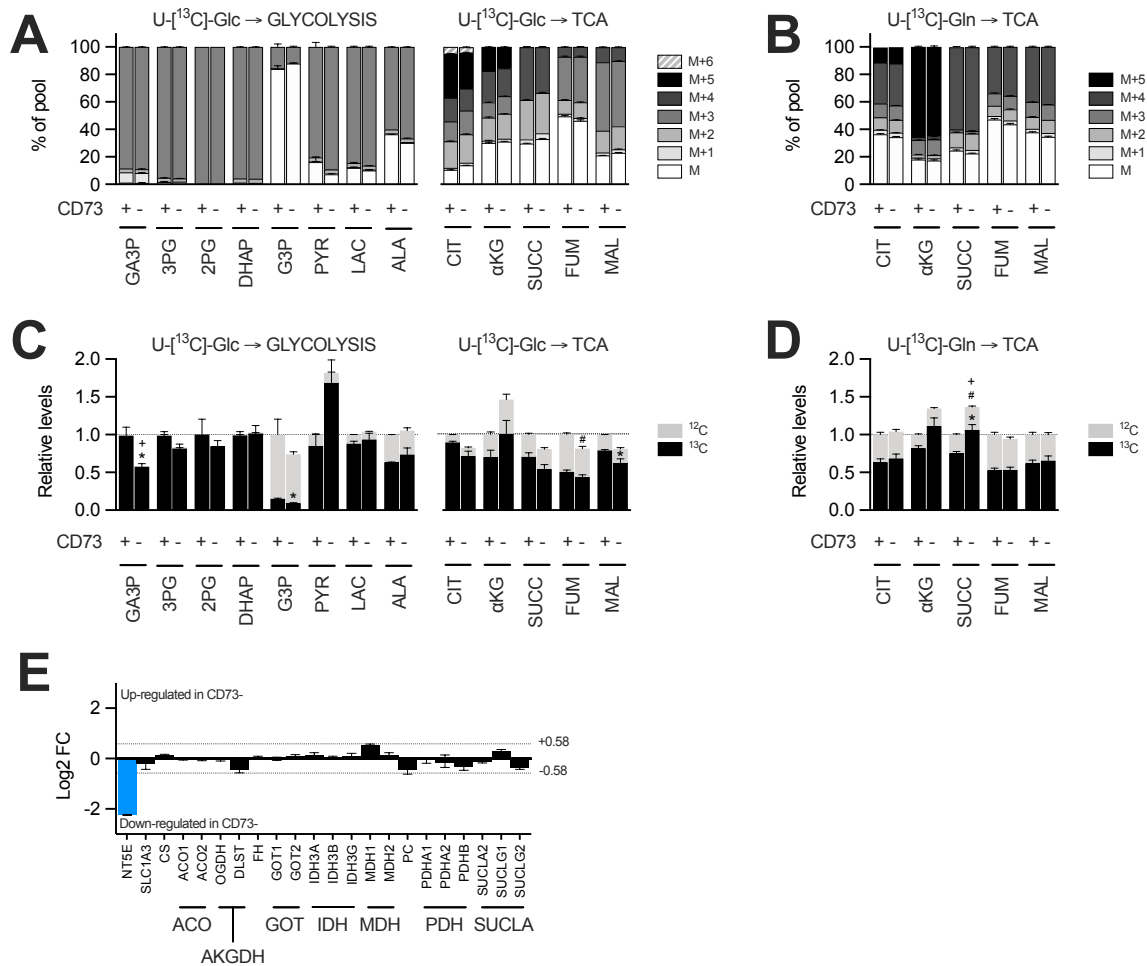


Figure S5.2 – Glucose and glutamine SITA and transcriptional analysis of TCA cycle enzymes in MDA-231 cells. **A-D** Stable isotope tracer analysis (SITA) of cells cultured with U-¹³C-glucose or U-¹³C-glutamine for 3h in vitro. Isopotomer distribution of U-¹³C-glucose (**A**) and U-¹³C-glutamine (**B**) in metabolites from glycolytic and TCA cycle pathways compared between CD73⁺ and CD73⁻ cells. Glucose (**C**) and glutamine (**D**) contribution to glycolytic and TCA intermediates. Metabolites levels (**C-D**) were normalized on cell number and are shown relative to CD73⁺ cells (n=1 per tracer). Stats: *comparison of ¹³C levels; #Comparison of ¹²C levels; +Comparison of total ¹³C+¹²C levels. **E** Transcriptional analysis by microarray of TCA enzymes showing gene regulation (Log₂ of fold change; FC) in CD73⁻ compared to CD73⁺ MDA-231 cells. Dashed line show threshold of 1.5-fold change (+/-0.58 Log₂ of FC). CD73 (NT5E; blue bar) is shown as an internal control (n=1). Means +/- SEM are shown (*p<0.05 by 2-tailed unpaired Student T tests).

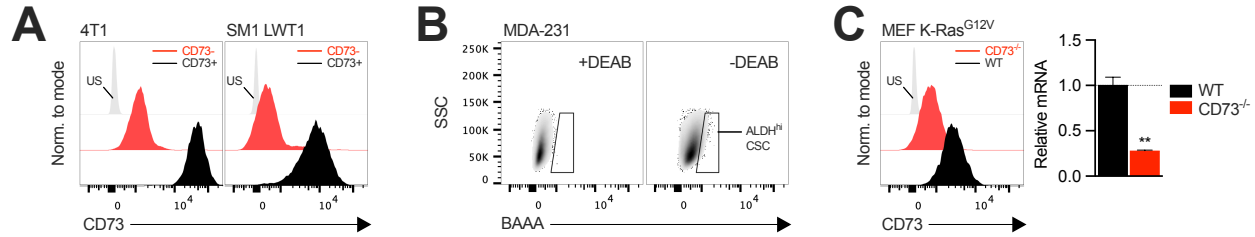


Figure S5.3 – Generation of mouse CRISPR CD73-knockout cell lines, strategy for cancer stem (CSC)-like cells sorting and CD73 expression on primary fibroblasts from mice genetically deficient for CD73. **A** Knockout efficiency of CD73 on 2 mouse cancer cell lines (4T1 and SM1 LWT1) following CRISPR-Cas9 gene edition. Cell sorting enrichment was confirmed by FACS. **B** Gating strategy for MDA-231 CSC sorting based on ALDH-mediated conversion of fluorescent BAAA. The gating is defined in presence of DEAB according to manufacturer protocol, an inhibitor of ALDH enzymatic activity. **C** Mouse embryoblastic fibroblasts (MEF) were derived from WT and CD73^{-/-} and transformed with an oncogenic K-Ras. Emerging transformed clones were subsequently isolated and analyzed for CD73 surface protein expression and *Nt5e* gene expression (n=2). Means +/- SEM are shown (**p<0.01 by 2-tailed unpaired Student T tests).

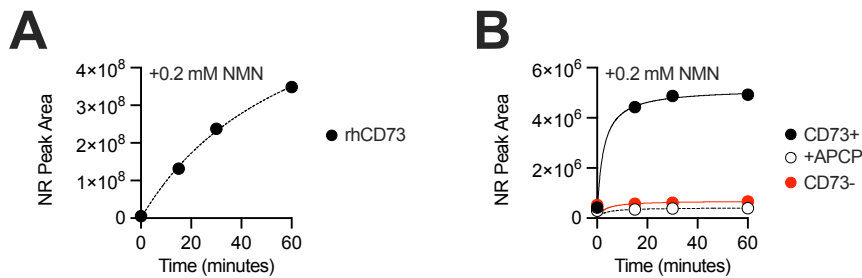


Figure S5.4 – Extracellular metabolism of NMN by CD73. **A-B** LC-MS analysis of nicotinamide riboside (NR) production over 60 minutes in supernatant of recombinant protein hCD73 (**A**; rhCD73 n=1) and of adherent CD73⁺ (+/- 40µM APCP) or CD73⁻ MDA-231 cells (n=2) (**B**) incubated with 0.2 mM nicotinamide mononucleotide (NMN). NR levels are shown as area under peak by MS analysis.

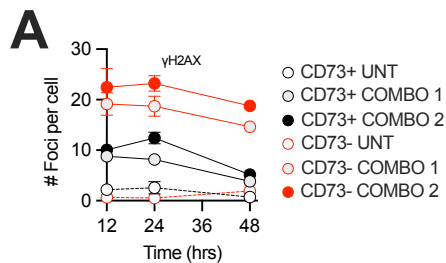


Figure S5.5 – CD73-deficient cells sustain higher chemotherapy-induced DNA-damage over time. **A** Number of γ H2AX foci per untreated (UNT) and treated CD73⁺ and CD73⁻ MDA-231 cells measured at 12-48h after addition of treatments. Combo 1 = carboplatin 0.5µM + olaparib 1.25µM. Combo 2 = carboplatin 0.5µM + olaparib 2.5 µM (n=1). Means +/- SEM are shown.

5.10 Résultats connexes

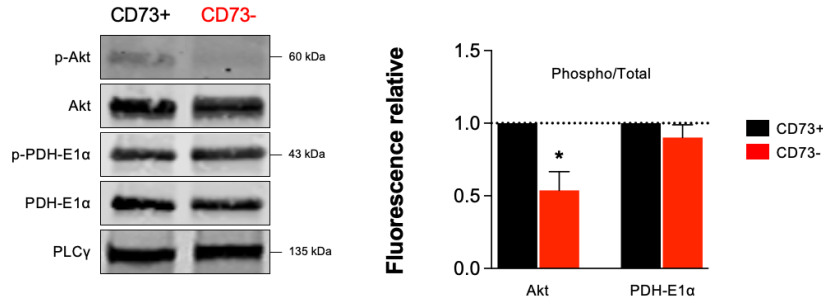


Figure C5.1 – L’expression de CD73 ne régule pas la phosphorylation de la sous-unité E1α du complexe PDH dans les cellules MDA-MB-231. Le western blot a été fait tel que décrit à la section 5.4.12 avec les anticorps suivants; *rabbit anti-phospho-Akt* (1:1000; Cell Signaling; #4060), *rabbit anti-Akt* (1:1000; Cell Signaling; #4691), *rabbit anti-phospho-PDH-E1α* (1:1000; Abcam; #ab92696), *anti-rabbit PDH-E1α* (1:1000; Abcam; #ab168379) et *mouse anti-PLCγ* (1:2000; Millipore, #05-163). La moyenne +/- SEM est montrée (* $p < 0.05$ par test T de Student, bilatéral et non-apparié, $n=3$).

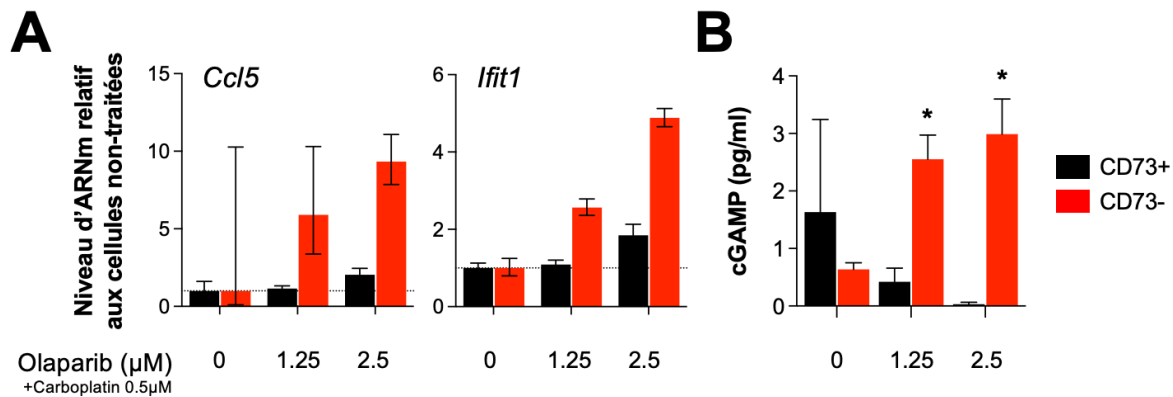


Figure C5.2 – L’activation de la voie cGAS-STING est augmentée dans les MDA-MB-231 déficientes pour CD73. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec une combinaison d’olaparib (0 – 2.5μM) et de carboplatin (0.5μM) tel que décrit à la figure 8.5, pendant 48h. **A** Expression génique mesurée par RT-qPCR des gènes cibles de STING dans les cellules CD73+ et CD73- ($n=2$). **B** Quantification de la sécrétion de cGAMP extracellulaire dans le surnageant des cellules CD73+ et CD73- mesuré par ELISA selon le protocole du fournisseur (Cayman Chemical; #501700, $n=1$). La moyenne +/- SEM est montrée (* $p < 0.05$ par test T de Student, bilatéral et non-apparié).

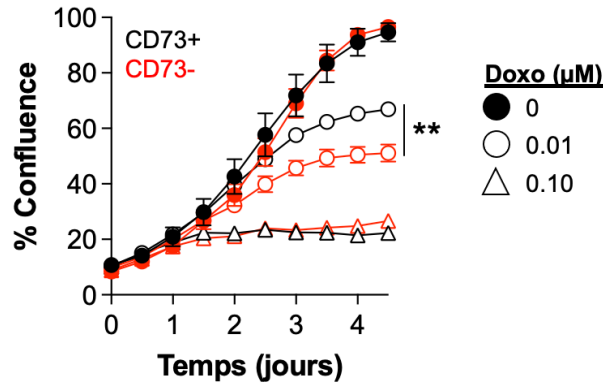


Figure C5.3 – Les cellules déficientes pour CD73 sont plus sensibles à la doxorubicine *in vitro*. Analyse Incucyte de prolifération *in vitro*, tel que décrit à la section 5.4.5, des cellules MBA-MB-231 CD73+ et CD73- traitées à la doxorubicine (0 – 0.1 μ M). La moyenne +/- SEM est montrée (** $p < 0.01$ par test T de Student, bilatéral et non-apparié, $n=3$).

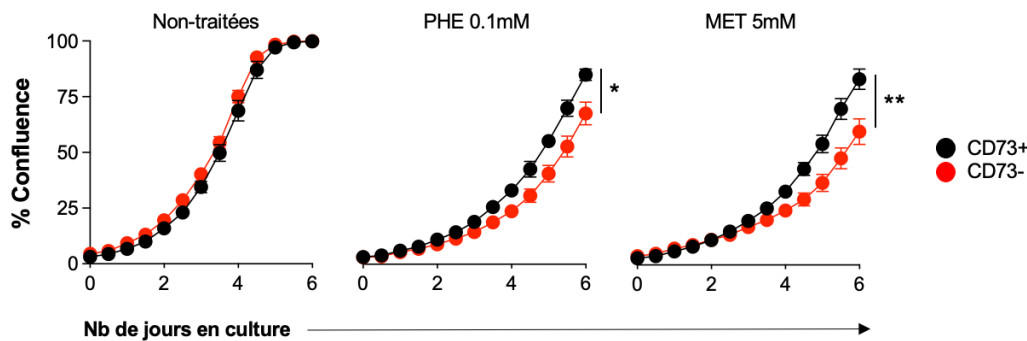


Figure C5.4 – L'absence de CD73 sensibilise les cellules cancéreuses aux biguanides *in vitro*. Activité thérapeutique du metformin (MET 5mM) et phenformin (PHE 0.1mM) dans l'inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro* des MDA-MB-231 CD73+ et CD73-, dans un milieu de culture traditionnel sans pyruvate (25 mM glucose, 4 mM glutamine), tel que décrit à la section 5.4.5. La moyenne +/- SEM est montrée (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ par test T de Student, bilatéral et non-apparié, $n=2$).

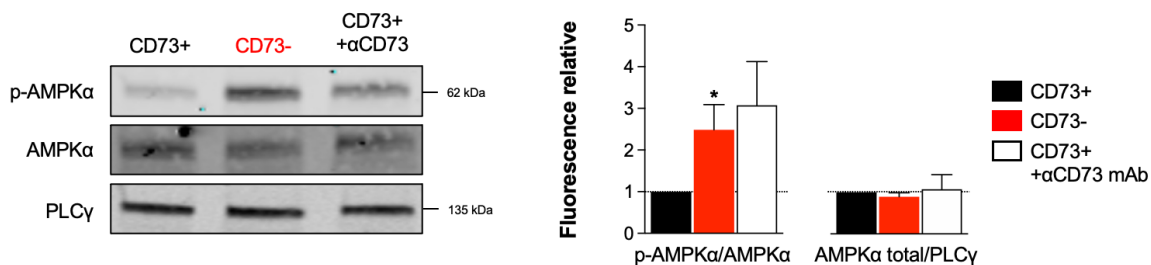


Figure C5.5 – L'inhibition de CD73 induit l'activation d'AMPK dans les MDA-MB-231. Le western blot a été fait tel que décrit à la section 5.4.12 avec les anticorps suivants; *rabbit anti-phospho-AMPKα* (1:1000; Cell Signaling; #2535), *rabbit anti-AMPKα* (1:1000; Cell Signaling; #5831) et *mouse anti-PLCγ* (1:2000; Millipore, #05-163). La moyenne +/- SEM est montrée (* $p < 0.05$ par test T de Student, bilatéral et non-apparié, $n=2$).

Chapitre 6 – Discussion et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse s'articulent autour d'un thème principal décomposé en 3 projets : le rôle de CD73 dans la vaccination à polysaccharides contre *S. pneumoniae* (#1), le rôle de CD73 dans la pathogénèse de la LLC (#2) et le rôle de CD73 dans le métabolisme des cellules cancéreuses (#3). Au-delà du point commun central aux différents projets (CD73), certaines conclusions tissent des liens entre les projets de façon à fournir des pistes de réflexions pour des travaux futurs.

6.1 Réflexion sur le rôle de la signalisation adénosinergique dans la commutation isotypique

Avec la première étude présentée au chapitre 3, cette thèse explore le rôle de la signalisation adénosinergique via le récepteur A2a dans la commutation isotypique de classe en réponse à l'immunisation au PPV23 chez la souris. Les résultats présentés identifient CD73 et le récepteur A2a comme déterminants importants, mais pas essentiels, dans la commutation de classe vers l'isotype IgG3 rapidement suivant l'immunisation au PPV23. En effet, bien que l'absence de l'un ou de l'autre retarde l'accumulation d'anticorps dirigés contre *S. pneumoniae*, les souris adultes déficientes pour CD73 ou A2a sont tout de même protégées contre une infection au pneumocoque (**Figures 3.3 et 3.4**). Néanmoins, l'activation du récepteur A2a augmente l'efficacité d'immunisation au PPV23 et la protection des jeunes souris contre l'infection *S. pneumoniae* (**Figure 3.5**) et suggère donc une applicabilité clinique potentielle de cette stratégie thérapeutique, du moins, dans les populations à risque de bas âge.

D'un point de vue mécanistique, la raison pour laquelle l'absence de CD73 ou A2a retarde la commutation isotypique demeure inconnue. Des résultats préliminaires n'indiquent aucune différence dans la survie selon l'expression de CD73 des lymphocytes B-1a et B-1b stimulés *in vitro* (**Figure C3.1**). *In vitro*, la commutation de classe d'IgM vers IgG3 s'initie via la conjugaison de la signalisation du BCR et des récepteurs TLR (812). Étonnamment, des données préliminaires révèlent que la commutation isotypique n'est vraisemblablement pas affectée par l'absence de CD73 sur les différentes populations de lymphocytes B de souris lorsque stimulés *in vitro* en présence d'un ligand du TLR4 (LPS) (**Figure C3.2**).

La déficience dans la commutation isotypique n'étant pas intrinsèque aux lymphocytes B déficients pour CD73, les conclusions de cette thèse sont donc en accord avec un rôle de la signalisation adéno-energique pertinent *in vivo*, dans un environnement complexe faisant intervenir plusieurs facteurs exogènes. Ainsi, afin d'approfondir les connaissances quant au rôle de CD73 dans la commutation isotypique et en accord avec la littérature, des études futures pourraient s'intéresser au rôle de CD73 et l'adénosine dans la production de cytokines favorisant le processus telles que l'IL-21 (813, 814) ainsi que dans la circulation des lymphocytes B-1 vers la rate en réponse à l'immunisation au PPV23 (603, 815-817).

6.2 Réflexion sur l'immunisation contre *S. pneumoniae* chez les patients atteints de la LLC

À cause d'un dérèglement du système immunitaire, les infections sont d'importantes causes de mortalité chez les patients atteints de la LLC (818). En effet, l'hypoglobulinémie est associée à un risque accru de mortalité et d'infections bactérienne (819). Étant donné que l'infection au *S. pneumoniae* est fréquente chez les patients atteints de la LLC, plusieurs études ont évalué l'efficacité des divers vaccins dans cette population à risque. Alors que les vaccins de types conjugués (PCV7-13) offrent une protection limitée chez environ la moitié des patients (820-822), l'immunisation au PPV23 est généralement largement insuffisante chez la totalité des patients atteints de la LLC, plus particulièrement lorsque la maladie est avancée (823-826). Plusieurs protocoles expérimentaux ayant pour but d'améliorer la réponse humorale suivant l'immunisation de ces patients ont été testés, mais aucune stratégie n'offre de réels bénéfices (825-828). Actuellement, il est recommandé d'immuniser contre le *S. pneumoniae* tôt dans l'évolution de la LLC (829).

L'élucidation de nouvelles stratégies qui favorisent l'immunisation contre *S. pneumoniae* en réponse aux vaccins offerts permettra de mieux faire face à la menace que pose ces infections chez les patients à risques atteints de la LLC. Alors que les résultats présentés au chapitre 3 supportent l'idée de stimuler l'axe adéno-energique et le récepteur A2a afin de moduler la réponse à l'immunisation au PPV23, l'applicabilité clinique chez les patients atteints de la LLC n'est probablement pas optimale et requiert davantage d'études, étant donnée le rôle pro-tumorigénique

de CD73 et la signalisation adénosinergique supposé dans la progression de la leucémie, tel que postulé dans cette thèse (chapitre 4).

6.3 Discussion du rôle de l'axe adénosinergique dans la progression de la LLC

L'inhibition de points de contrôle immunologique démontre un potentiel thérapeutique prometteur dans le traitement de la LLC. Tel que discuté au chapitre 1, CD73 favorise la progression tumorale dans plusieurs modèles murins de tumeurs solides. Les résultats présentés au chapitre 4 de cette thèse suggèrent que CD73 contribue à la progression tumorale de la LLC et établissent les bases pour étudier le potentiel thérapeutique de cibler CD73 à des fins thérapeutiques. Tel que discuté à la section 1.3.2, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est particulièrement importante pour le traitement de la LLC étant donné les multiples difficultés rencontrées par les thérapies actuelles.

6.3.1 CD73 et l'immunité anti-tumorale dans la LLC

Tel que discuté à la section 1.3.4, le rétablissement de l'immunité anti-tumorale est une avenue de plus en plus explorée pour le traitement de la LLC. Le rôle de la signalisation adénosinergique dans la LLC (discuté à la section 1.3.5) n'est cependant pas entièrement compris. Les résultats présentés au chapitre 4 sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle CD73 est un point de contrôle immunologique et favorise la progression de la LLC.

D'abord, en accord avec la littérature (617), cette thèse supporte l'hypothèse selon laquelle l'axe adénosinergique est présent dans l'environnement tumoral entourant la croissance des cellules leucémiques de la LLC (**Figure 4.1**). De façon à valider l'importance de l'axe adénosinergique dans la progression de la LLC, cette thèse rapporte ensuite une survie prolongée des souris leucémiques génétiquement déficientes pour CD73 (**Figure 4.2**). Cependant, de façon intrigante, seules les souris mâles présentent une protection accrue en absence de CD73. De plus, en accord avec l'hypothèse selon laquelle CD73 favorise la croissance tumorale de la LLC, la neutralisation prolongée de l'interféron gamma de manière à supprimer les réponses immunitaire anti-tumorales supprime l'effet protecteur de l'absence de CD73 dans les souris leucémiques mâle (**Figure 4.3**).

Enfin, tel que décrit dans la littérature, en plus de présenter certaines dysfonctions immunitaires, les souris transgénique E μ -TCL1 présentent un déséquilibre de la proportion de lymphocytes T spléniques vers l'acquisition d'un phénotype de cellules effectrices qui reflète la présence d'une certaine immunité anti-tumorale (591, 830-832). De façon consistante, les résultats présentés au chapitre 4 suggèrent que les souris leucémiques mâles déficientes pour CD73 démontrent une surveillance immunitaire anti-tumorale accrue (**Figure 4.3C**). En effet, dans une autre étude, la diminution du ratio de cellules T CD8 effectrices (CD44⁺CD62L⁻) par rapport aux cellules mémoires centrales (CD44⁺CD62L⁺) est observée dans les souris leucémiques E μ -TCL1 IRF4^{-/-} chez qui la survie est raccourcie en comparaison aux souris leucémiques contrôles (IRF4^{+/+}) (833). Plus encore, cette même étude suggère que les faibles ratios de lymphocytes T effecteurs par rapport aux cellules mémoires sont associés à une progression plus rapide de la leucémie chez des patients humains de LLC (833). De façon consistante, la progression de la leucémie est accélérée dans les souris E μ -TCL1 dépourvues de lymphocytes T CD8, démontrant ainsi leur rôle dans le contrôle anti-tumoral (834).

6.3.2 La signalisation A2a dans la LLC

Tel que discuté à la section 1.3.5.4, plusieurs évidences suggèrent un rôle au récepteur A2a dans la progression de la LLC. Plus récemment, dans un modèle de LLC induite par transfert adoptif de cellules leucémiques, l'inhibition du récepteur A2a rétablit plusieurs déficiences immunes liées à la progression tumorale (617). Plus particulièrement, de façon consistante avec les observations présentées dans cette thèse, l'inhibition du récepteur A2a augmente la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8 (**Figure 6.1**) (617).

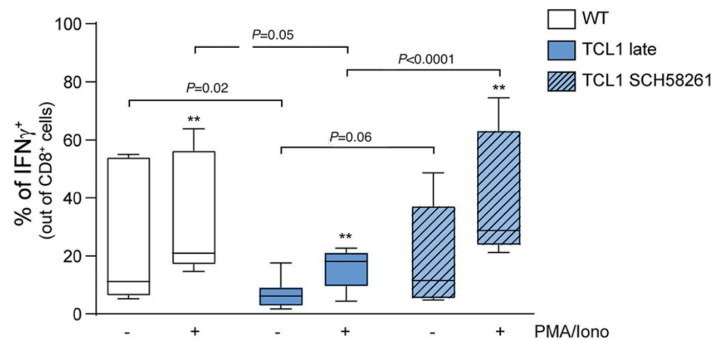


Figure 6.1 – L'inhibition du récepteur A2a rétablit la production d'IFN- γ des lymphocytes T CD8 dans un modèle de souris de LLC. Les splénocytes de souris de souris saines (WT) et leucémiques par transfert adoptif de cellules leucémiques (TCL1) non-traitées (*late*) ou traitées avec un inhibiteur du récepteur A2a (SCH58261) ont été cultivés *in vitro* en présence (+) ou non (-) de PMA (20 μ g/mL) et d'ionomyicine (1 μ g/mL) pendant 6 heures. Les

pourcentages de cellules T CD8 qui produisent de l'IFN- γ après l'activation *in vitro* ont été mesurés par FACS. (** $p < 0.01$ par test de Wilcoxon; données appariées pour même groupe expérimental. Le test de Mann-Whitney non-apparié a été utilisé pour comparer les groupes de traitements).

© Reproduit de Arruga et al. Haematologica, 2020. Avec la permission de Ferrata Storti Foundation.

Malgré tout, cette étude ne rapporte aucun contrôle de la charge tumorale leucémique dans les souris traitées à l'inhibiteur du récepteur A2a (617). De façon intrigante et en accord avec cette conclusion, des résultats additionnels issus du croisement des souris transgéniques E μ -TCL1 à des souris déficientes pour A2a ne révèlent aucun avantage de survie lorsque le récepteur A2a est absent (**Figure C4.1**).

Ces observations suggèrent que l'inhibition de la signalisation adénoenergique via le récepteur A2a ne suffit pas à nuire à la progression de la LLC, du moins chez la souris. Alors que ces observations sont, à première vue, surprenantes, quelques hypothèses peuvent expliquer cette conclusion. D'abord, une étude rapporte que l'inhibition du récepteur A2a est bénéfique dans certains modèles murins de tumeurs solides sur une courte période, mais que son inhibition prolongée est plutôt délétère (183). Plus précisément, l'absence prolongée de signalisation médiée par le récepteur A2a précipite la mort cellulaire induite par l'activation des lymphocytes T (AICD) (183). Alternativement, l'adénosine peut également générer une activité pro-tumorigénique depuis la signalisation médiée par le récepteur A2b dans d'autres cancers (94). De plus, la signalisation A2b est décrite pour favoriser l'immunosuppression médiée par les cellules myéloïdes (MDSC) dans divers modèles de cancers murins (131, 140, 178) et favorise la production d'IL-10 par les macrophages (835), les cellules dendritiques (125), les cellules de la microglie (836) ainsi que les cellules cancéreuses cervicales (837). Notamment, la proportion élevée de MDSC qui produisent de l'IL-10 ou du TGF- β 1 est associée avec la sévérité de la maladie chez les patients atteints de la LLC (838). Enfin, autant les cellules de LLC humaines ou murines dérivées des souris transgéniques E μ -TCL1 produisent de façon constitutive l'IL-10, de sorte à nuire à l'immunité anti-tumorale. En effet, la progression de la LLC est ralentie dans les souris déficientes pour le récepteur à l'IL-10 via l'augmentation de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T (839). Le rôle de la signalisation A2b dans la pathophysiologie de la LLC n'a pas encore été étudié.

Finalement, il est possible qu'en plus de son rôle dans la suppression de l'immunité anti-tumorale, CD73 contribue également à la tumorigénicité intrinsèque des cellules leucémiques de

sorte à masquer l'effet protecteur de l'inhibition de la signalisation adénoenergique seule. Cette hypothèse est discutée en de plus amples détails dans la section 6.4.

6.3.3 *Relation entre le sexe et CD73 dans la progression de la LLC*

L'importance relative de la signalisation adénoenergique entre les mâles et les femelles est largement inconnue et la raison pour laquelle les femelles ne contrôlent pas aussi bien la LLC lorsque déficientes pour CD73 demeure incertaine.

Quelques évidences relient l'expression de CD73 à la régulation hormonale. D'abord, l'estrogène maintient l'expression de CD73 et CD39 sur les ostéoclastes durant la ménopause chez la souris (43). L'expression du récepteur à l'estrogène $\beta 2$ est par ailleurs plus élevée sur les cellules mononuclées du sang périphérique de patients atteints de la LLC en comparaison à celles de sujets sains (840). Par ailleurs, la délétion ciblée de CD73 sur les hépatocytes augmente la sévérité du développement spontané de maladie hépatique chez les souris mâles en comparaison aux souris femelles (841). Alors que la raison pour ce phénomène n'est pas expliquée, une augmentation compensatoire de l'expression de CD39 et des quatre récepteurs à l'adénosine sur les hépatocytes déficients en CD73 des femelles est observée (841). Toutefois, dans les souris transgéniques E μ -TCL1, l'expression de CD73 et de CD39 sur les leucocytes ne diffère que très peu entre les femelles et les mâles (**Figure 4.1**) et la progression de la LLC ainsi que le temps de survie des souris leucémiques ne diffèrent aucunement entre les mâles et les femelles, et ce, de façon indépendante des hormones tel que démontré par l'absence d'effet de l'ablation des gonades sur la progression de la LLC (**Figure S4.1 et S4.4**). Ces observations ne suggèrent donc pas que l'axe adénoenergique régule la progression de la LLC différemment entre les souris leucémiques mâles et femelles. De façon intéressante, en utilisant un modèle murin de métastases induites, une récente étude rapporte une augmentation d'IL-10 dans le microenvironnement tumoral des souris femelles en comparaison aux mâles (842). Étant donné le rôle pro-tumorigénique de l'IL-10 dans la LLC (839), il est possible que l'absence de la signalisation adénoenergique ne protège pas suffisamment les souris leucémique femelles le cas où celles-ci produisent davantage d'IL-10.

Malgré tout, alors que cette thèse ne parvient pas à expliquer clairement pourquoi les souris leucémiques déficientes pour CD73 présentent une évolution différente de la maladie selon le sexe,

cette observation soulève plusieurs questions quant à la conduite d'études précliniques en cancer. En effet, la prise en considération du sexe dans les études précliniques et cliniques est parfois négligée, mais est primordial au design optimal et sécuritaire de nouvelles thérapies (843). Alors que les hommes constituent une population plus à risque dans le cas de la LLC et que les observations présentées dans cette thèse demeurent pertinentes à la réalité clinique, la variabilité intersexuelle mérite davantage d'attention dans le design d'études précliniques au sens plus large.

6.4 Réflexion sur le rôle pro-tumorigénique intrinsèque de CD73 dans la LLC

Alors que certaines observations présentées au chapitre 4 de cette thèse suggèrent que CD73 favorise la progression tumorale via son rôle immunosuppresseur, il n'est pas impossible que l'expression de CD73 sur les cellules leucémiques contribue à leur tumorigénicité intrinsèque également. Par exemple, alors que CD39 est impliqué dans la production de l'adénosine en amont de CD73, l'ADA est responsable de la dégradation de l'adénosine en aval de CD73. Ainsi, les observations (discutées aux sections 1.3.5.2 et 1.3.5.3) selon lesquelles l'expression de CD39 et l'activité de l'ADA sont associées à un pronostic favorable et défavorable respectivement chez les patients atteints de la LLC s'aligne difficilement avec l'hypothèse d'un rôle uniquement pro-tumorigénique de l'adénosine. De façon consistante avec la littérature et l'hypothèse de fonctions pro-tumorigéniques intrinsèque à l'expression de CD73, les résultats présentés à la **figure 4.4** suggèrent que l'expression de CD73, mais pas CD39, sur les cellules leucémiques humaines est associé à un mauvais pronostic. Tel que présenté au chapitre 5, CD73 possède également un rôle pro-tumorigénique indépendant de son activité immunosuppressive via la régulation du métabolisme des cellules cancéreuses.

6.4.1 Le métabolisme cellulaire dans la LLC

Tel que discuté à la section 1.4.3.1, CD38 est largement responsable de la dégradation et la déplétion du NAD⁺ (302, 710-712). De façon contre-intuitive au rôle essentiel que joue le NAD⁺ dans la survie et la progression tumorale, son expression est associée à des leucémies plus agressives et difficiles à traiter (352). Toutefois, dans la LLC, ses fonctions pro-tumorigéniques sont plutôt associées à son rôle dans l'amplification de la signalisation du BCR et la recirculation des cellules leucémiques (456-459).

Chez les patients atteints de la LLC, la respiration mitochondriale des cellules leucémiques est supérieure à celle des lymphocytes B normaux, est supérieure chez les patients réfractaires à la chimiothérapie et est associée à des marqueurs d'agressivité (844, 845). En effet, les cellules leucémiques de la LLC dépendent davantage de l'oxydation des acides gras et de l'activité mitochondriale que de la glycolyse pour leur fonctionnalité (571, 845-849). Cibler l'activité mitochondriale des cellules leucémiques est d'ailleurs étudié à des fins thérapeutiques pour traiter la LLC (847, 848, 850, 851). Les conclusions de cette thèse supportent donc l'exploration du rôle métabolique de CD73, s'il existe, dans les cellules leucémiques de la LLC.

6.4.2 Réflexion sur la relation entre le sexe, le métabolisme cellulaire et CD73

Des études révèlent des différences intrinsèques dans les fonctions mitochondriales entre les mâles et les femelles. Chez les humains, les femmes présentent des fonctions de respiration mitochondriales augmentées dans plusieurs types cellulaires en comparaison aux hommes (852, 853). Certaines similarités sont également observées chez les rats et les souris (854, 855). Plus particulièrement, chez les souris C57Bl/6 femelles, la biogénèse mitochondriale est significativement augmentée (855). Hypothétiquement donc, l'absence de CD73 chez les femelles n'affectent peut-être pas autant le métabolisme des cellules leucémiques que chez les mâles. Toutefois, alors qu'il est possible que CD73 puisse réguler l'activité tumorigénique intrinsèque des cellules leucémiques de la LLC de façon plus pertinente chez les mâles, étant donné qu'il est suggéré que la signalisation estrogénique régule la biogénèse mitochondriale chez les femelles, l'observation selon laquelle l'ovariectomie des femelles leucémiques ne prolonge pas la survie des souris déficientes pour CD73 demeure difficile à concilier avec cette hypothèse. Néanmoins, l'étude future de l'activité métabolique des cellules leucémiques issues de souris mâles et femelles qui expriment ou non CD73 pourraient aider à éclaircir ces pistes de recherche et certaines questions laissées en suspens par cette thèse.

6.5 Le métabolisme et la signalisation adénosinergique dans les cellules cancéreuses

Puisque l'adénosine est grandement responsable de plusieurs des activités biologiques de CD73, tel que discuté au chapitre 1, le rôle de la signalisation adénosinergique dans la régulation métabolique a été exploré selon diverses hypothèses. Alors qu'aucune hypothèse reliant la

signalisation adénoenergique à l'activité métabolique n'a pu être validée dans le modèle des MDA-MB-231, il n'est pas impossible qu'il en soit autrement dans d'autres contextes tumoraux.

6.5.1 *La voie de signalisation de PGC1 α*

D'abord, tel que discuté aux sections 1.4.5.1 et 1.4.5.2, plusieurs études établissent un lien entre le cAMP et la biogénèse mitochondriale via la régulation du co-activateur transcriptionnel PGC1 α . Invalidant cette hypothèse dans les MDA-MB-231, l'absence de CD73 ne produit pas de diminution de la masse mitochondriale ni de l'expression des différents acteurs moléculaires de la voie de signalisation de PGC1 α (**Figure 5.3**). Aussi, contrairement à ce qui a été montré pour le rôle de CD39 et du cAMP dans la biogénèse mitochondriale et la transcription des complexes de la ETC dans les cellules de la leucémie myéloïde aiguë, l'absence de CD73 n'affecte pas la transcription génique d'aucune sous-unité des complexes de la ETC (**Figure 5.3**). Ces observations suggèrent fortement que la signalisation adénoenergique ne régule ni la biogénèse mitochondriale ni l'activité métabolique des cellules MDA-MB-231.

6.5.2 *Le complexe PDH*

La PDH constitue le complexe enzymatique limitant dans l'alimentation du cycle de Krebs depuis la glycolyse en catalysant la conversion du pyruvate en acétyl-CoA. Son activité est régulée via différents sites de phosphorylation de la sous-unité E1 du complexe (856). Dans des cellules de cancer de la tête et du cou humain, la signalisation intracellulaire dépendante de PI3K-Akt module la respiration mitochondriale via la régulation de l'activité du complexe PDH (857). Plus précisément, l'inhibition de la signalisation PI3K-Akt augmente la phosphorylation de la sous-unité E1 α du complexe PDH de sorte à inhiber son activité enzymatique (857). L'expérience de traçage de l'isotope de glucose ^{13}C suggère une accumulation potentielle de pyruvate intracellulaire dans les cellules MDA-MB-231 déficientes pour CD73 (**Figure S5.2**). Étant donné plusieurs évidences dans la littérature de l'implication de la signalisation adénoenergique dans la voie de signalisation PI3K-Akt (68, 137, 138, 858), cette observation aurait pu suggérer un rôle de CD73 dans la respiration mitochondriale via la régulation de l'activité enzymatique de PDH. Des résultats préliminaires ne supportent toutefois pas cette hypothèse dans les cellules MDA-MB-231. En effet, alors que la phosphorylation d'Akt est effectivement diminuée dans les cellules

déficientes pour CD73, aucune différence de phosphorylation de la sous-unité E1 α n'est observée (**Figure C5.1**).

6.5.3 *L'adénosine et l'inosine intracellulaire*

Tel que discuté au chapitre 1, alternativement à l'activation de récepteurs transmembranaires, l'adénosine extracellulaire peut être transportée à l'intérieur de la cellule ou être métabolisée en inosine. Alors qu'aucune évidence ne suggère un rôle de l'adénosine intracellulaire dans la régulation du métabolisme cellulaire, il en est autrement pour l'inosine. En effet, tel que décrit à la section 1.4.5.3, l'inosine peut alimenter le métabolisme des lymphocytes T CD8 (809). Alors qu'il demeure inconnu si un tel rôle de l'inosine peut être également observé dans les cellules cancéreuses, une observation présentée au chapitre 5 ne concorde pas avec cette hypothèse, du moins dans les cellules MDA-MB-231. En effet, si l'inosine ou l'adénosine modulait l'activité métabolique des MDA-231, la présence d'une protéine recombinante humaine de l'ADA (rhADA) dans les cultures de cellules qui expriment CD73 devrait réguler positivement ou négativement l'activité métabolique des cellules, ce qui n'a pas été observé (**Figure 5.2**). Autrement dit, si l'adénosine régula positivement l'activité métabolique des MDA-231, il serait attendu que l'ajout de rhADA diminue l'activité métabolique mesurée. Au contraire, si l'inosine régula positivement l'activité métabolique des cellules, il serait plutôt attendu que l'ajout de rhADA augmente l'activité métabolique mesurée.

6.6 **CD73 et la voie de récupération du NAD⁺**

Tel que discuté à la section 1.4.3.2, le rôle de CD73 dans la voie de récupération de la biosynthèse de NAD⁺ intracellulaire est disputé par une récente étude. Alors que de neutraliser l'expression de CD73 à la surface n'affecte pas les niveaux intracellulaires de NAD⁺ des cellules MCF-7 (722), les résultats présentés au chapitre 5 de cette thèse sont en accord avec plusieurs autres études qui placent CD73 à un point central de la voie de récupération de NAD⁺ depuis la conversion du NMN extracellulaire en NR (717, 718, 723, 724). Afin de confirmer, sans équivoque, l'implication de CD73 dans cette voie de récupération, des études futures pourraient s'orienter autour d'expériences de traçage similaires à celles décrites à la section 5.3.6 et dans la littérature (718). Autrement dit, l'utilisation de molécules de NMN marquées et l'étude de la

distribution intracellulaire et extracellulaire de l'isotope d'oxygène ^{18}O en fonction de l'expression de CD73 aiderait à confirmer le rôle que joue cette enzyme dans la voie de récupération du NAD⁺.

Néanmoins, les résultats présentés dans cette thèse supportent l'hypothèse selon laquelle l'expression de CD73 contribue à la biosynthèse du NAD⁺ en contournant l'activité de l'enzyme NAMPT, via la voie de récupération du NAD⁺ extracellulaire (717, 723). De façon consistante, une étude rapporte que la réduction des niveaux intracellulaires de NAD⁺ via l'inhibition de NAMPT améliore l'activité thérapeutique de l'olaparib dans des cellules de TNBC (801), corroborant ainsi les observations présentées à la **figure 5.5** selon lesquelles les cellules cancéreuses déficientes pour CD73 sont plus sensibles à l'accumulation de dommage à l'ADN lorsque traitées à l'olaparib.

6.7 CD73 et les dommages à l'ADN

Les résultats présentés au chapitre 5 suggèrent que l'absence de CD73 sensibilise les cellules cancéreuses à l'accumulation de dommages à l'ADN non-résolus en réponse à la chimiothérapie (**Figure 5.5**). Tel que discuté à la section 1.4.2.4, le métabolisme OxPhos est fréquemment associé à la résistance aux thérapies anti-cancéreuses. Plus précisément, il est suggéré que l'activité métabolique des cellules cancéreuses est liée de près aux réponses aux dommages à l'ADN (859).

6.7.1 Signalisation adénosinergique

Plusieurs études récentes ont démontré un rôle protecteur du récepteur A2b dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, via un mécanisme partiellement compris mais qui implique vraisemblablement la transactivation du récepteur EGFR et les voies de signalisations intracellulaires dépendantes de ERK et PI3K, l'activation du récepteur A2b accélère la réparation des dommages à l'ADN induits par l'irradiation et son inhibition sensibilise les cellules cancéreuses à la radiothérapie *in vivo* (860-862).

Bien que les observations présentées dans cette thèse ne mettent pas en évidence de lien entre la signalisation adénosinergique et l'activité métabolique des cellules cancéreuses MDA-MB-231, il n'est pas impossible que celle-ci joue un rôle indépendant du métabolisme dans la

réparation des dommages à l'ADN tel que décrit dans la littérature. Alors que cette thèse n'exclut pas cette hypothèse, les résultats présentés au chapitre 5 suggèrent que CD73 contribue, au moins en partie, à la réparation des dommages à l'ADN via l'augmentation des processus de PARylation, consistant avec la littérature (801) et tel que discuté à la section 6.6.

6.7.2 *La voie de synthèse des pyrimidines*

La régulation des pools de nucléotides peut influencer les processus de réparation et de réplication de l'ADN (859). La respiration mitochondriale peut ainsi contribuer à la réparation de l'ADN via son rôle indirect dans la synthèse de pyrimidines. En effet, l'aspartate ainsi que le NAD⁺ sont requis pour la conversion du précurseur inosine-5'-monophosphate en adénine-5'-monophosphate et en guanine-5'-monophosphate respectivement (681, 863, 864). De façon intéressante, une étude récente montre que l'inhibition de GLS1 dans les cellules cancéreuses qui dépendent de la glutamine pour alimenter le cycle de Krebs résulte en une diminution des pools de nucléotides (865). De plus, l'utilisation de l'olaparib augmente l'efficacité anti-tumorale d'un inhibiteur de GLS1 (865). Ainsi, les diminutions de la respiration mitochondriale (**Figure 5.2**), de la biosynthèse de NAD⁺ (**Figure 5.4**) et de la production d'aspartate (**Figure 5.1**) dans les cellules déficientes pour CD73 sont consistantes avec l'accumulation accrue de dommages à l'ADN observée dans ces cellules (**Figure 5.5**).

6.7.3 *Voie de signalisation cGAS-STING*

Plusieurs études suggèrent un rôle important dans l'activation de la voie de signalisation STING suivant des dommages à l'ADN et le contrôle immunitaire anti-tumoral. Les cellules de mammifères ont évolué de façon à se prémunir de corps étrangers via diverses façons, dont la reconnaissance de matériel génétique par l'enzyme cytosolique cGAS (GMP-AMP synthase) (866). En effet, en présence d'ADN endogène ou exogène, cGAS permet la génération du second messenger cGAMP (GMP-AMP cyclique) qui active la transcription de gènes pro-inflammatoires de la famille des IFN de type 1 via la protéine adaptatrice STING (866). Étant donné que l'activation de la voie cGAS-STING est également observée dans les cancers (866, 867), il est possible qu'un meilleur contrôle immunitaire anti-tumoral envers les tumeurs déficientes pour CD73 soit également tributaire de l'accumulation de dommages à l'ADN non-résolus et à l'activation de la voie cGAS-STING, notamment en réponse à l'olaparib. En effet, l'inhibition de

PARP dans un modèle murin du cancer de l’ovaire BRCA1 muté exerce une activité anti-tumorale partiellement dépendante de l’activation de STING et des lymphocytes T anti-tumoraux (868). De façon mécanistique, il est suggéré que l’activation de cGAS dans les cellules tumorales induise la sécrétion de cGAMP extracellulaire qui est capté par les cellules immunes présentatrices d’antigènes, permettant l’induction d’une réponse immunitaire anti-tumorale dépendante de la signalisation de l’IFN de type 1 via l’activation de STING par cGAMP (**Figure 6.2**) (866-868).

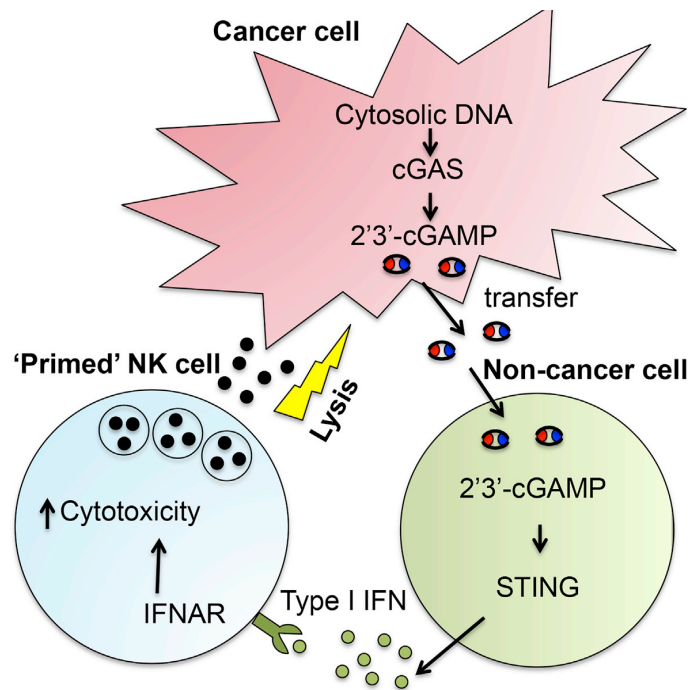


Figure 6.2 – Représentation graphique du modèle selon lequel l’activation de cGAS dans les cellules tumorales induit une réponse immunitaire anti-tumorale via l’activation de STING dans les cellules immunes. La production de cGAMP (2’3’-cGAMP) dépendante de cGAS par les cellules tumorales active la voie de signalisation STING des cellules immunitaires qui sont présentes dans le microenvironnement tumoral. Ceci mène à la production d’IFN de type I par celles-ci de façon à activer la réponse immunitaire anti-tumorale dépendante des cellules NK.

© Reproduit de Marcus et al. *Immunity*, 2018. Avec la permission de Elsevier.

Par ailleurs, une récente étude suggère que l’activation de la voie cGAS-STING dans les tumeurs sensibilise les MDA-MB-231 de façon paracrine au paclitaxel indépendamment d’un contrôle immunitaire anti-tumoral (869). Plus précisément, via la production de cytokines induites par l’activation de cGAS-STING, les cellules cancéreuses exposées au paclitaxel induisent l’expression de NOXA des cellules avoisinantes de sorte à favoriser l’apoptose lorsque combiné à l’inhibition de Bcl-xL (869). L’activité anti-tumorale du paclitaxel est d’ailleurs augmentée dans un modèle murin immunocompétent de TNBC lorsque combinée à l’inhibition de CD73 (207).

Enfin, plus récemment, une étude propose que l'activation de la voie cGAS-STING survienne lors de l'inhibition de la synthèse pyrimidique (870). Plus précisément, dans le but de compléter les pools cytosoliques de nucléotides via l'enzyme TREX1, le relargage d'ADN mitochondrial dans le cytosol qui survient en réponse au déséquilibre nucléotidique peut également se lier à l'enzyme cGAS (870).

De façon consistante, une expérience préliminaire suggère une induction plus importante de la transcription des gènes en aval de la signalisation cGAS-STING et une sécrétion plus marquée du second messager cGAMP dans le surnageant des cellules MDA-MB-231 déficientes pour CD73 lorsque traitées à l'olaparib en combinaison au carboplatine (**Figure C5.2**). Il reste à déterminer cependant si l'absence de CD73 sur les cellules cancéreuses favorise l'activité d'agents thérapeutiques tels que l'olaparib ou le paclitaxel de façon dépendante de l'activation de la voie cGAS-STING *in vivo*.

6.7.4 Résistance à la chimiothérapie

Tel que discuté à la section 1.1.4.4, CD73 est également associé à la chimiorésistance dans certains contextes. Alors que son implication dans la résistance à la doxorubicine est partiellement dépendante de l'activité immunitaire anti-tumorale (207), une autre étude associe la résistance à la vincristine des cellules de glioblastome qui expriment CD73 à l'activité d'un transporteur de la famille ABC (244). De plus, une étude récente démontre que la respiration mitochondriale, mais pas la glycolyse, est particulièrement importante à l'activité des transporteurs ABC de sorte à contribuer à la chimiorésistance des cellules cancéreuses (871). En plus des résultats présentés au chapitre 5 qui démontrent une accumulation plus importante des foci γ H2AX dans les MDA-MB-231 déficientes pour CD73 traitées à la doxorubicine (**Figure 5.5**), des résultats préliminaires suggèrent que l'absence de CD73 sensibilise les cellules cancéreuses à l'inhibition de la prolifération induite par la doxorubicine (0.01 μ M) *in vitro* (**Figure C5.3**). Les conclusions de cette thèse sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle CD73 puisse contribuer à la chimiorésistance des cellules cancéreuses via la régulation de la respiration mitochondriale.

6.8 Réflexion sur la glycolyse et CD73

L'observation d'une réduction de la réserve glycolytique dans les cellules déficientes en CD73 soulève des questions quant au rôle de l'enzyme dans la régulation du métabolisme glycolytique. Tel que discuté à la section 1.4.5, le récepteur A2a régule le métabolisme glycolytique des cellules endothéliales de la rétine via l'expression d'enzymes glycolytiques (802). Les observations présentées dans cette thèse ne corroborent cependant pas de rôle métabolique de la signalisation adénosinergique dans les cellules cancéreuses.

Tout comme pour la respiration mitochondriale, le NAD⁺ cytosolique joue un rôle important au métabolisme glycolytique (636, 872). En effet, dans des cellules du cancer de la prostate, l'expression de CD38 réduit les niveaux intracellulaires de NAD⁺ de sorte à nuire au métabolisme glycolytique, en plus de la respiration mitochondriale (873). Curieusement, les résultats présentés à la **figure 5.2** ne suggèrent pas de dysfonctionnement intrinsèque de la glycolyse de base dans les cellules déficientes pour CD73, mais plutôt une perte de flexibilité glycolytique. La LDH joue un rôle important au métabolisme glycolytique de façon à régénérer le NAD⁺ cytosolique via la conversion du pyruvate en lactate qui s'accompagne de l'oxydation du NADH produit par l'enzyme G3PDH (**Figure 1.14**) (872, 874). En effet, lorsque l'ATP synthase est inhibée (par l'oligomycine par exemple), la ETC étant couplée à son activité cesse de fonctionner. Ainsi, en présence d'oligomycine, le pyruvate n'est plus redirigé au métabolisme mitochondrial, mais est plutôt converti en lactate ce qui permet la régénération de NAD⁺ requis au métabolisme glycolytique. Puisque la mesure de ECAR reflète indirectement la production de lactate, de façon consistante, les résultats présentés dans cette thèse suggèrent que la biosynthèse accrue de NAD⁺ dans les cellules qui expriment CD73 maximise la flexibilité glycolytique des cellules cancéreuses lorsque la respiration mitochondriale est inhibée par l'oligomycine (**Figure 5.4**).

6.9 Réflexion sur les cellules souches cancéreuses et le rôle métabolique de CD73

Tel que discuté dans les sections 1.1.4.5 et 1.4.2.4, plusieurs études associent le fonctionnement des CSC au métabolisme OxPhos et à l'expression de CD73. Alors que le rôle de l'enzyme CD73 dans le maintien des fonctions des CSC n'est pas entièrement compris, deux études démontrent que l'expression de CD73 sur les CSC est primordiale à la tumorigénicité de

celles-ci (271, 272). Plus précisément, alors qu'aussi peu que 500 cellules de cancer du rein efficaces pour CD73 suffisent à produire des tumeurs dans 100% des souris immuno-déficientes, aucune souris ne développe de tumeur à l'intérieur de 120 jours lorsqu'injectée jusqu'à 100 000 cellules déficientes pour CD73 (272). Plusieurs évidences démontrent que l'OxPhos est aussi essentiel à la tumorigénicité des CSC (690-692, 694, 706). De façon consistante, la metformine inhibe l'accumulation de ces populations dans le cancer de l'ovaire (778, 785). De plus, l'inhibition de l'enzyme NAMPT dans le but d'inhiber la synthèse de NAD⁺ intracellulaire augmente l'efficacité thérapeutique du cisplatine en visant les CSC dans un modèle de cancer de l'ovaire (875).

Sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses, dont les MDA-MB-231, l'activité élevée de l'ALDH identifie une population qui présente des caractéristiques de cellules souches (876) et l'inhibition de CD73 diminue la tumorigénicité des CSC à activité ALDH élevée de tumeurs du pancréas (271). Lorsque triées sur la base de l'activité élevée de l'ALDH, les cellules MDA-MB-231 qui expriment CD73 présentent une activité métabolique (OxPhos et flexibilité glycolytique) supérieure aux cellules déficientes pour CD73, de façon consistante à l'ensemble des observations du chapitre 5 (**Figure 5.2**). Alors que cette thèse ne s'intéresse pas directement au rôle métabolique de CD73 dans la fonctionnalité des CSC, les résultats sont consistants avec l'hypothèse selon laquelle CD73 est important au maintien des populations de CSC via la régulation métabolique.

6.10 Opportunités thérapeutiques et CD73

Les résultats présentés au chapitre 5 de cette thèse dressent les bases de recherches futures dirigées vers l'identification de nouvelles options thérapeutiques autour de l'inhibition de CD73 en lien avec son rôle dans la régulation métabolique et des réponses aux dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses.

6.10.1 Biguanides

Tel que discuté à la section 1.4.4.2, une importante portion de l'activité thérapeutique des biguanides tel que la metformine et la phenformine dépendent de leur capacité à inhiber le CI de la ETC. Notamment, l'activité de la metformine dépend de facteurs environnementaux qui influencent l'apport intracellulaire de NAD⁺ et la synthèse d'aspartate (682). Des résultats

préliminaires générés *in vitro* suggèrent que l'absence de CD73 sensibilise les cellules cancéreuses à l'activité antiproliférative de la metformine et de la phenformine (**Figure C5.4**). Ces observations sont consistantes avec l'hypothèse selon laquelle CD73 nuit à l'activité thérapeutique des biguanides en contribuant à la synthèse d'accepteurs d'électron (NAD⁺) et d'aspartate.

Par ailleurs, l'activité biologique des biguanides dans les cellules immunitaires semble différer de celle observée dans les cellules cancéreuses. Notamment, une étude démontre d'abord que la metformine accentue la fonctionnalité des lymphocytes T CD8 mémoires en favorisant l'oxydation mitochondriale des acides gras (877). Ensuite, plusieurs études démontrent des rôles des biguanides dans l'inhibition de la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (M2) et de l'infiltration tumorale de MDSC et des Tregs (796, 878-881). De plus, la metformine diminue l'expression de CD39 et CD73 sur les MDSC (882). Ainsi, dans certains modèles, l'activité thérapeutique des biguanides est dépendante de la réponse immunitaire anti-tumorale et combine avec des inhibiteurs de points de contrôle immunologique (796, 878-880, 883, 884).

D'une part, il est possible que CD73 puisse représenter un déterminant environnemental à la sensibilité aux biguanides via son rôle dans le métabolisme oxydatif des cellules cancéreuses. D'autre part, étant donné le rôle immunosuppresseur de CD73 largement étudié, il est aussi possible que le potentiel thérapeutique des biguanides dans le traitement du cancer soit davantage augmenté lorsque combiné à l'inhibition de CD73. Le potentiel thérapeutique de cibler CD73 en combinaison à des inhibiteurs métaboliques dans des contextes tumoraux *in vivo* demeure inconnu toutefois, mais les observations présentées dans cette thèse justifient l'étude d'une telle combinaison thérapeutique.

6.10.2 Inhibiteurs de glutaminolyse

Tel que discuté à la section 1.4.4.1, l'inhibition de la glutaminolyse est étudiée à des fins thérapeutiques en cancer. Les résultats présentés au chapitre 5 suggèrent que l'expression de CD73 aide à la survie et la prolifération des cellules cancéreuses en conditions limitantes de glutamine (**Figure 5.1**). En utilisant un inhibiteur de plusieurs enzymes impliquées dans la glutaminolyse (DON (885)), une étude récente démontre que d'inhiber le métabolisme de la glutamine altère la

croissance tumorale en réduisant le métabolisme OxPhos et en limitant la synthèse de plusieurs intermédiaires du cycle de Krebs dont l'aspartate (754). Le DON induit également l'activation de la protéine AMPK, via la diminution de la production d'ATP et l'augmentation du ratio AMP/ATP, et réduit l'expression du facteur de transcription c-MYC ce qui résulte en une diminution de l'activité glycolytique (754). De façon consistante avec un rôle de CD73 dans la régulation métabolique des cellules cancéreuses, en plus d'augmenter le ratio AMP/ATP (**Figure 5.3**), l'inhibition de CD73 sur les MDA-MB-231 augmente également la phosphorylation de la protéine AMPK (**Figure C5.5**). Les résultats de cette thèse ne permettent pas de conclure, par contre, si l'activation de la protéine AMPK explique la perte de flexibilité glycolytique des cellules cancéreuses déficientes en CD73, étant donné son rôle variable dans la reprogrammation métabolique (886-888). Néanmoins, de par son rôle dans la régulation de l'activité mitochondriale et la production d'aspartate, de futurs travaux pourraient étudier le potentiel thérapeutique de cibler CD73 afin d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à des inhibiteurs métaboliques de la glutaminolyse tel que le DON.

6.10.3 *Les inhibiteurs de PARP*

Tel que discuté à la section 1.4.4.4, l'inhibition de PARP est utilisée à des fins thérapeutiques dans le traitement de certains cancers. En utilisant le NAD⁺ comme substrat, les PARPs initient le recrutement de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, notamment via l'ADP-ribosylation des histones H2AX (889, 890). De façon mécanistique, les inhibiteurs de PARP compétitionnent avec le NAD⁺ au site catalytique des enzymes. En absence de réparation des dommages à l'ADN par la déficience de BRCA, les inhibiteurs de PARP induisent la mort cellulaire (889). Malgré tout, des études rapportent que l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de PARP ne se limitent pas qu'aux tumeurs mutées pour BRCA (891), mais il reste encore beaucoup d'inconnu dans la compréhension des mécanismes déterminant la sensibilité à ces inhibiteurs (889).

Faisant suite à la section 6.7.3, selon une étude, contrairement aux cellules BRCA1-mutées, l'exposition à l'olaparib seul (7.5 μ M) pendant 24 heures ne suffit pas à induire l'activation de la voie de signalisation cGAS-STING dans les cellules du cancer de l'ovaire efficientes pour BRCA1 (868). Cette conclusion est consistante avec les observations préliminaires générées depuis les

MDA-MB-231 qui ne présentent pas de déficience pour BRCA1 où l'activation de la voie cGAS-STING est très faible en réponse à l'olaparib (**Figure C5.2**). De plus, l'utilisation seule d'olaparib sur les MDA-MB-231 parentales qui expriment CD73 ne permet que très peu d'accumulation de foci γ H2AX jusqu'à 5 μ M pendant 48 heures (**Figure 5.5C**). À l'inverse, les cellules déficientes pour CD73 accumulent beaucoup plus de dommages à l'ADN non-résolus, déjà lorsqu'exposées à des doses plus faibles d'olaparib (**Figure 5.5C**). Ainsi, en accord avec la littérature et les observations présentées dans cette thèse, il serait intéressant d'étudier davantage l'hypothèse selon laquelle l'absence de CD73 sensibilise les cellules cancéreuses à l'inhibition de PARP.

6.11 Réflexion et perspectives sur l'étude du métabolisme cellulaire

Une limitation importante des études métaboliques réside dans la complexité de l'environnement extracellulaire dans les différents tissus et la relation entre celui-ci et l'activité métabolique des cellules. Étant donné que les milieux de culture traditionnels sont empiriquement conçus de façon à supporter la prolifération rapide des cellules plutôt que d'imiter les conditions physiologiques retrouvées dans les tissus et le microenvironnement tumoral, ceux-ci peuvent contenir jusqu'à 5 et 7 fois plus de glucose et glutamine, respectivement, que les concentrations plasmatiques usuelles (639, 892). Étant donné que l'apport de nutriments dans le microenvironnement tumoral est réduit via la vascularisation limitée et la grande compétitivité intercellulaire, les niveaux de glucose et glutamine sont davantage inférieurs dans les tumeurs que dans les milieux de culture traditionnels (639, 781). En intégrant un certain niveau de complexité de la composition du microenvironnement tumoral, le chapitre 5 de cette thèse identifie un rôle préalablement inconnu de CD73 dans la prolifération cellulaire dans des conditions métaboliquement éprouvantes. En effet, cette thèse rapporte qu'alors que l'absence de CD73 à la surface des cellules cancéreuses n'affecte pas la prolifération cellulaire *in vitro* lorsque cultivées dans un milieu de culture traditionnel, la diminution de la concentration en glucose ou en glutamine affecte de façon plus importante la prolifération des cellules cancéreuses dépourvues de CD73. Bien que la diminution des niveaux de glucose et de glutamine ne capture pas l'entièreté de la complexité du microenvironnement tumoral, ces observations suggèrent à tout le moins que CD73 aide les cellules cancéreuses à proliférer dans des conditions métaboliques difficiles et soulignent l'importance de la composition des milieux de culture lors d'études *in vitro*.

Par ailleurs, pour certaines lignées de cellules cancéreuses, la dépendance au métabolisme glycolytique est en fait un reflet des concentrations supra-physiologiques de glucose retrouvées dans les milieux de culture (892). Ainsi, dans plusieurs cas, les cellules qui présentent des défauts du métabolisme OxPhos, notamment par des mutations au niveau du CI de la ETC, sont plus sensibles aux niveaux réduits de glucose dans leur environnement (781). Ce biais métabolique dérivé des techniques de culture traditionnelles est également particulièrement important quand vient le temps d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'inhibiteurs métaboliques (781). En effet, sur plusieurs lignées cellulaires, les biguanides tels que la phenformine et la metformine sont plus efficaces dans des conditions physiologiques (780, 781). Enfin, la présence de pyruvate dans les milieux de culture annule également l'efficacité thérapeutique de la metformine *in vitro* (682). Plus précisément, en agissant comme accepteur d'électron, le pyruvate exogène supplée à l'activité du CI de la ETC dans la production d'aspartate de façon à soutenir la prolifération cellulaire en présence de metformine (682).

Tel que discuté à la section 1.4.2.4, plusieurs études établissent un lien clair entre la respiration mitochondriale et la production d'aspartate, un métabolite limitant pour la croissance tumorale. Les résultats présentés au chapitre 5 suggèrent que CD73 contribue au métabolisme oxydatif via la biosynthèse intracellulaire de NAD⁺. La respiration mitochondriale augmentée est consistante avec des niveaux supérieurs d'aspartate dans les cellules tumorales qui expriment CD73. Alors que les expériences de traçage d'isotope ¹³C suggèrent une diminution de production d'aspartate dans les cellules déficientes pour CD73 même dans des conditions supra-physiologiques de glucose et de glutamine, la prolifération cellulaire *in vitro* ne s'en trouve pas affectée (**Figure 5.1**). Le sauvetage de la production d'aspartate dans les cellules déficientes pour CD73 est cependant important à la prolifération cellulaire lorsque la présence de glutamine dans le milieu est réduite (**Figure 5.1**). À la lumière de ces observations, il est probable que la déficience métabolique des cellules déficientes pour CD73 est, au moins en partie, compensée par les conditions de culture supra-physiologique de sorte à masquer certains défauts de prolifération tumorale.

6.11.1 Perspectives sur le rôle de CD73 dans le métabolisme des cellules cancéreuses

Tel que discuté à la section 1.1.4.4, plusieurs études rapportent un rôle pro-tumorigénique à CD73 sur les cellules MDA-MB-231 qui est indépendant de son activité immunosuppressive. Alors que plusieurs mécanismes d'action sont proposés dans la littérature, aucune hypothèse n'est validée par le sauvetage de la croissance tumorale *in vivo* dans les tumeurs où CD73 est inhibé (251-254, 893). En utilisant une stratégie développée par Sullivan et al. (894), cette thèse démontre que la croissance tumorale accélérée dans les tumeurs efficientes pour CD73 est grandement dépendante de la production d'aspartate (**Figure 5.1**). Malgré tout, alors que le sauvetage de la production d'aspartate suffit à rétablir la croissance tumorale des cellules déficientes pour CD73, cette étude n'établit pas de lien clair entre la croissance tumorale *in vivo* et le rôle de CD73 dans la respiration mitochondriale et la voie de récupération du NAD⁺. Consistant avec un tel lien, toutefois, l'efficacité anti-tumorale de la metformine dans un modèle murin du cancer du poumon est associée avec une réduction des niveaux de NAD⁺ et d'aspartate intra-tumoraux (**Figure 6.3**) (682). En effet, l'inhibition de la production d'aspartate est particulièrement importante pour l'activité thérapeutique anti-tumorale de la metformine *in vivo* (894).

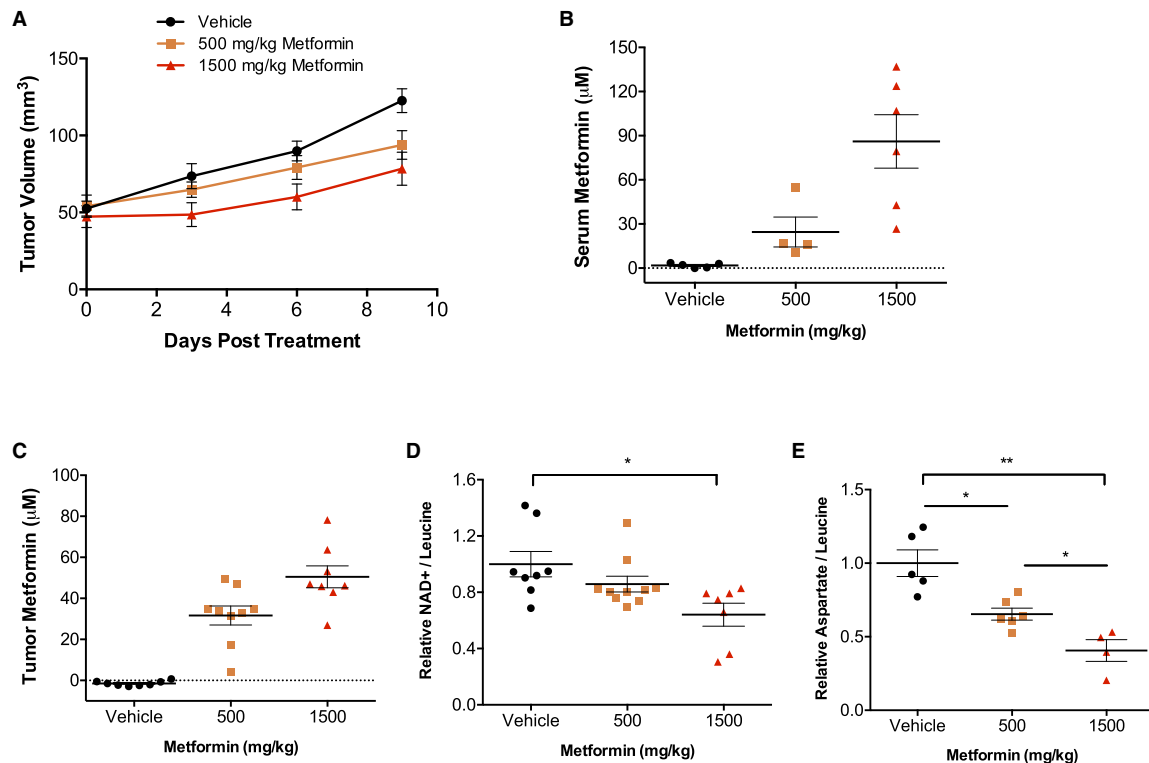


Figure 6.3 – La metformine réduit la croissance tumorale ainsi que les niveaux de NAD⁺ et d’aspartate intra-tumoraux. (A) La croissance tumorale des xénogreffes de cellules d’adénocarcinome de poumon (A549) dans des souris immuno-déficientes (SCID) a été mesurée suivant l’administration quotidienne de metformine (par gavage). (B-C) Concentrations sériques (B) et tumorales (C) de metformine mesurée dans des souris traitées pendant 10 jours. (D-E) Niveaux relatifs (normalisés sur le compte total d’ion de leucine) intra-tumoraux de NAD⁺ (D) et d’aspartate (E) mesurés dans les tumeurs après 10 jours de traitement à la metformine. La moyenne +/- SEM est montrée (*p<0.05; **p<0.01 par test T de Student, bilatéral et non-apparié).

© Reproduit de Gui et al. Cell Metab, 2016. Avec la permission de Elsevier.

Afin de valider l’hypothèse selon laquelle CD73 favorise la croissance tumorale *in vivo* via son rôle dans la régulation métabolique des cellules cancéreuses, des études futures pourraient s’intéresser à l’activité hydrolytique de CD73 via le traçage de NMN marqué dans des tumeurs ainsi qu’à l’effet de la supplémentation en NR dans la croissance tumorale de xénogreffes dans des souris immuno-déficientes en fonction de CD73 (**Figure 6.4**). Étant donné l’effet positif du NR sur la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par les lymphocytes T CD8 (discuté dans la section 6.12.1), si la supplémentation de la diète avec le NR augmente également la croissance tumorale de certains modèles, cette approche thérapeutique pourrait alors faire preuve d’un couteau à double tranchant, d’où l’importance d’approfondir nos connaissances quant au rôle de CD73 dans la régulation métabolique des cellules cancéreuses dans un environnement tumoral complexe. Toutefois, le rôle de CD73 dans la régulation métabolique des cellules immunitaire, s’il y a lieu, n’est peut-être pas aussi important que sur les cellules cancéreuses en comparaison à l’activité immunosuppressive de l’adénosine largement décrite sur celles-ci. Les expériences proposées ici pourraient aider à éclaircir certains questionnements.

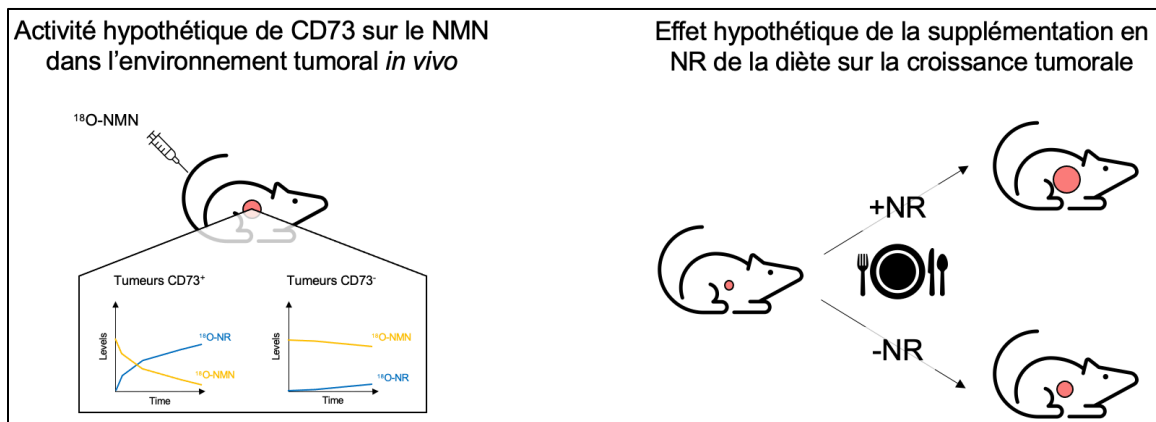


Figure 6.4 – Représentation schématique de l’effet hypothétique de CD73 dans la conversion du NMN en NR dans le microenvironnement tumoral et de l’effet du NR sur la croissance tumorale.

6.11.2 *Perspective sur le rôle de CD73 et le métabolisme cellulaire dans d'autres pathologies*

Puisque cette thèse ne s'est intéressée qu'au rôle de CD73 dans la régulation métabolique des cellules cancéreuses, il est incertain si un tel rôle est préservé dans d'autres types de cellules non-cancéreuses. Le métabolisme mitochondrial étant toutefois impliqué dans d'autres maladies (895), il n'est pas impossible que CD73 joue divers rôles pathophysiologiques dans des maladies cardiovasculaires ou dans le diabète de type 2, notamment (896-898).

6.12 Réflexion et perspective sur le rôle de CD73 dans le métabolisme des cellules immunitaires

En plus des cellules cancéreuses, le métabolisme cellulaire est important pour la régulation des fonctions de plusieurs types de cellules immunitaires. Enfin, étant donné le rôle important et généralisé de la signalisation adénoenergique sur l'activité de la plupart des cellules immunitaires, l'impact de la régulation du métabolisme par CD73 et la voie de récupération du NAD⁺, s'il y a lieu, est fort probablement dépendant de l'importance relative de ces voies dans un contexte donné. Autrement dit, puisque l'adénosine exerce d'office une activité inhibitrice sur plusieurs types de cellules immunitaires, celle-ci est donc susceptible d'influencer indirectement la reprogrammation métabolique lors de l'activation de ces cellules. Ainsi, l'importance du rôle de CD73 dans la voie de récupération du NAD⁺ dépendra donc de l'importance de la signalisation adénoenergique dans les cellules immunitaires selon le contexte environnemental donné. Les implications du rôle, s'il y a lieu, de CD73 dans la régulation du métabolisme des cellules immunitaires demeure néanmoins hautement pertinentes dans le design de thérapies anti-cancéreuses.

6.12.1 *Lymphocytes T CD8*

Tel que discuté à la section 1.4.5.3, l'adénosine exerce une activité principalement négative sur l'activité métabolique des lymphocytes T CD8 et des cellules NK (108, 810). En effet, dans les lymphocytes T CD8 activés, l'activation de PKA via la signalisation du récepteur A2a inhibe la phosphorylation de la protéine S6 en aval du complexe mTORC1, ce qui résulte en une réduction de l'activité métabolique glycolytique et de phosphorylation oxydative (108). Alors qu'il ait été démontré que PKA régule positivement l'activité de PGC1 α et du métabolisme oxydatif dans certaines cellules cancéreuses (804-806), cette étude suggère autrement dans les cellules immunitaires.

Le rôle de CD73 sur l'activité métabolique des lymphocytes T est largement inconnu. Une récente étude suggère que CD73 limite la consommation de glucose par les lymphocytes T CD8 via la signalisation adénoenergique (808). Cette étude suggère ensuite que l'absence de signalisation adénoenergique favorise le métabolisme OxPhos des lymphocytes T CD8 suivant leur activation (**Figure 6.5**). Alors que ces résultats montrent que l'expression de CD73 nuit à l'activité métabolique des lymphocytes T CD8 en absence de glucose, curieusement l'inhibition de l'ATP synthase avec l'oligomycine ne produit pas d'augmentation du métabolisme glycolytique (ECAR), contrairement à ce qui est habituellement attendu et suggère que le métabolisme glycolytique prédomine largement la phosphorylation oxydative dans ces condition (**Figure 6.5**).

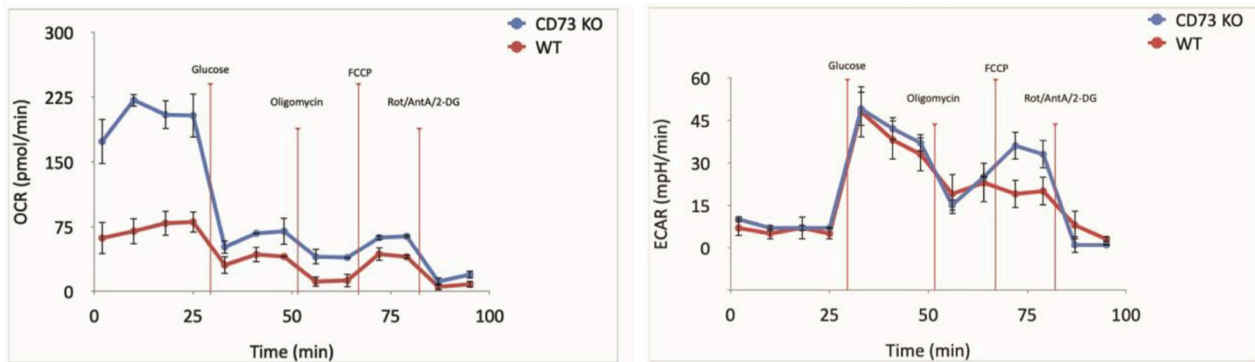


Figure 6.5 – Profil métabolique des lymphocytes T CD8 de souris exprimant CD73 ou non activés *in vitro*. Des lymphocytes T CD8 naïfs isolés de souris WT et CD73KO ont été cultivés *in vitro* en présence d'anticorps solubles anti-CD3/CD28 (1 µg/mL) et d'IL-2 (10 ng/mL) pendant 3 jours. Les taux de consommation d'oxygène (OCR; gauche) et d'acidification extracellulaire (ECAR; droite) ont par la suite été mesurés avec un analyseur Seahorse.

© Reproduit de Briceño et al. Front Cell Dev Biol, 2021. Avec la permission de Frontiers.

Alors que la reprogrammation métabolique depuis la β -oxydation des acides gras vers l'augmentation de l'incorporation du glucose et du métabolisme glycolytique survient rapidement suivant l'activation des lymphocytes T (899-901), la respiration mitochondriale demeure pourtant très importante au bon fonctionnement des lymphocytes T. D'abord, en induisant l'augmentation de l'expression de l'enzyme Pgam1 ou en utilisant le 2-NBDG pour inhiber l'enzyme Hk2 de façon à favoriser et inhiber le métabolisme glycolytique respectivement, une étude laisse présager un rôle important du métabolisme mitochondrial dans la génération de lymphocytes T CD8 mémoires (899). D'ailleurs, la stimulation antigénique chronique qui mène à l'épuisement des lymphocytes T CD8 est associée à une perte de fonction mitochondriale (902, 903). En effet, une récente étude

suggère que de rétablir le métabolisme OxPhos dans les lymphocytes T CD8 épuisés rétablit leur prolifération et leurs fonctions effectrices (904). Par ailleurs, la glutaminolyse et les niveaux de NAD⁺ intracellulaire sont aussi importants à l'activité anti-tumorale des lymphocytes T (905). De façon consistante, une étude récente démontre que le NR alimente la biosynthèse intracellulaire de NAD⁺ dans les lymphocytes T CD8 de façon à prévenir la perte de fonction mitochondriale associée à l'épuisement et à favoriser le contrôle immunitaire anti-tumoral dans des modèles de cancers murins (903). De façon intéressante, chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë, l'expression de CD73 est associée avec une augmentation de la fonctionnalité des lymphocytes T CD8 (906). En effet, en plus d'exprimer des niveaux supérieurs des marqueurs d'épuisement PD-1 et TIGIT, les cellules T CD8 qui n'expriment pas CD73 produisent également moins d'IL-2, de TNF- α et d'IFN- γ lorsqu'activées *in vitro* (906). Enfin, l'expression de CD73 est également associée à certaines populations pro-inflammatoires de lymphocytes T CD4 de type Th17 (907, 908).

Alors que certaines de ces études sont consistantes avec un rôle métabolique tel que décrit dans le chapitre 5 de cette thèse, l'implication de CD73 dans les fonctions métaboliques des lymphocytes T CD8 est toujours largement inconnue. Enfin, tout comme la reprogrammation métabolique, le profil d'expression de CD73 sur les lymphocytes T CD8 est dynamiquement régulé selon leur profil d'activation. Ainsi, CD73 est plutôt fréquemment exprimé sur les lymphocytes T naïfs et mémoires (909-911), soit des populations de cellules qui dépendent davantage du métabolisme mitochondrial que de la glycolyse pour leur fonctionnement (**Figure 6.6**) (901). De façon intéressante, une récente étude révèle que l'expression de CD73 sur les lymphocytes T CD8 de souris exerce des fonctions biologiques opposées selon le stade d'activation (912). En effet, l'absence d'expression de CD73 nuit à la prolifération *in vivo* des cellules CD8 T naïves, mais favorise l'accumulation de lymphocytes activés suivant une stimulation antigénique (912).

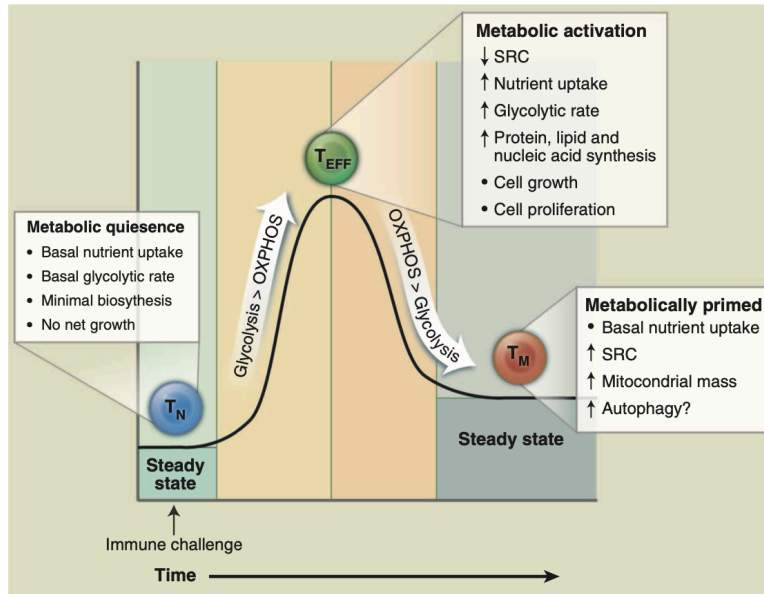


Figure 6.6 – Profil métabolique des lymphocytes T selon leur stade d'activation. Les lymphocytes T naïfs (T_N) sont métaboliquement quiescents et utilisent préférentiellement le métabolisme OxPhos pour maintenir leurs besoins énergétiques. Suivant une stimulation immunogénique, les lymphocytes T effecteurs (T_{EFF}) augmentent leur consommation de nutriments et leur activité métabolique de glycolyse au dépend du métabolisme OxPhos. La transition des T_{EFF} vers les lymphocytes mémoires (T_M) est caractérisée par un retour à un métabolisme davantage dépendant de la respiration mitochondriale (OxPhos). SRC=*spare respiratory capacity*.

© Reproduit de Pearce et al. Science, 2013. Avec la permission de AAAS.

6.12.2 Tregs

Tel que discuté à la section 1.1.4.3, CD73 est fréquemment et fortement exprimé sur les cellules Tregs et joue un rôle important à leur activité suppressive. La reprogrammation métabolique depuis la glycolyse vers l'OxPhos favorise les fonctions suppressives et la survie des Tregs dans le milieu tumoral hostile aux cellules immunitaires (913, 914). En effet, de façon à nuire à l'immunité anti-tumorale, via la diminution du glucose disponible et l'augmentation de la présence de lactate par les cellules tumorales, le microenvironnement tumoral nuit à la survie des lymphocytes T effecteurs, mais pas aux Tregs qui utilisent le lactate comme substrat métabolique via leur activité oxydative augmentée (**Figure 6.7**) (913, 914).

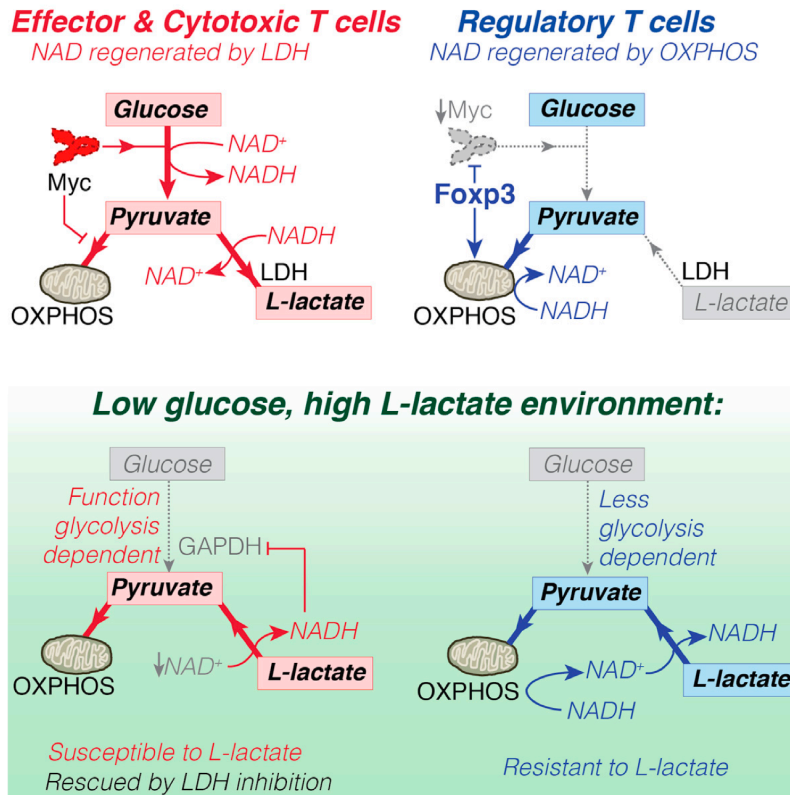


Figure 6.7 – Représentation schématique de la reprogrammation métabolique des Tregs. Le facteur de transcription FoxP3 inhibe le facteur de transcription Myc et favorise le métabolisme OxPhos au dépend de la glycolyse de façon à permettre la régénération de NAD⁺ plus efficacement leur conférant l’habilité de convertir le lactate en pyruvate et de garder leur fonctionnalité dans le microenvironnement tumoral riche en lactate et pauvre en glucose.

© Reproduit de Angelin et al. Cell Metab, 2017. Avec la permission de Elsevier.

Alors que le rôle métabolique de CD73 sur les cellules Tregs demeure inconnu, deux récentes études rapportent des observations consistantes avec l’hypothèse selon laquelle CD73 contribue au métabolisme oxydatif de ces cellules. En effet, CD73 est exprimé plus fortement sur les cellules Tregs qui dépendent davantage du lactate que du glucose pour subvenir à leurs fonctions suppressives (914). L’utilisation du lactate est requise aux cellules Tregs afin de maintenir leurs fonctions suppressives (914). Afin de pouvoir oxyder le lactate en pyruvate, les Tregs nécessitent la régénération du NAD⁺ d’où la respiration mitochondriale augmentée (**Figure 6.7**) (928). Ainsi, la diminution des niveaux intracellulaires de NAD⁺ nuit à l’activité suppressive et pro-tumorigénique des cellules Tregs (915). Via son rôle dans l’import d’acides gras dans les Tregs, la protéine CD36 contribue au fonctionnement mitochondrial et à la régénération de NAD⁺ (915). Notamment, dans les cellules Tregs déficientes pour CD36, la supplémentation en NR améliore la survie de ces cellules cultivées en conditions métaboliques strictes (915). Il demeure

inconnu, toutefois, si CD73 contribue aux fonctions suppressives des Tregs via la régulation du métabolisme oxydatif en parallèle de la production d'adénosine.

6.12.3 *Les lymphocytes B*

Plusieurs études supportent un rôle important du métabolisme cellulaire dans la fonctionnalité des lymphocytes B. En effet, la stimulation des lymphocytes B mène à l'augmentation du métabolisme OxPhos de manière essentielle à la prolifération, différenciation et production d'anticorps (916-918). L'importance de l'activité métabolique dans la commutation isotypique demeure largement incomprise. De façon intéressante, une récente étude démontre que les lymphocytes B-1 sont métaboliquement plus actifs que les cellules B-2 (919). En phase avec les observations présentées au chapitre 5 et tel que discuté à la section 1.2.3.3, les lymphocytes B-1 expriment des niveaux supérieurs de CD73 comparativement aux cellules B-2.

6.13 **Discussion des limitations des modèles expérimentaux utilisés**

L'utilisation de modèles animaux, dont les modèles murins, a permis de nombreuses avancées dans le développement de médicaments ainsi que dans la compréhension de divers processus physiologiques et pathologiques (920). Toutefois, aucun modèle animal ne reproduit ou ne prédit parfaitement les processus physiologiques de l'humain. À l'inverse, l'utilisation *in vitro* ou *ex vivo* de matériel biologique humain afin de pallier les particularités inter-espèces n'intègre que rarement la complexité organismique complète. Les limitations liées aux modèles expérimentaux utilisés dans cette thèse qui sont susceptibles d'influencer certaines interprétations des projets présentés sont discutées dans les sections qui suivent.

6.13.1 *Les souris de laboratoire et l'activité du système immunitaire*

Bien que les souris représentent un outil de valeur pour l'étude des processus immunologiques, une importante étude récente révèle que les conditions environnementales de laboratoire ont un effet important sur la maturation du système immunitaire des souris. En effet, il a été démontré que les conditions sanitaires strictes de laboratoire favorisent le maintien d'un état immunologique vierge chez les souris adultes qui est comparable au système immunitaire d'un nouveau-né humain (921). À l'inverse, les souris sauvages ou commerciales présentent plusieurs composantes immunologiques similaires à celles retrouvées chez l'humain adulte (921). Plus

particulièrement, en plus de niveaux sériques d'anticorps augmentés, l'étude démontre que les souris sauvages et commerciales présentent une plus grande résistance innée à l'aide de différents modèles d'infections parasitaires, bactériennes et virales (921). Il est donc possible que les conditions environnementales influencent les réponses immunitaires vaccinales et anti-tumorales telles qu'étudiées aux chapitres 3 et 4.

6.13.2 Les souris transgénique E μ -TCL1 et la LLC humaine

Tel que présenté au chapitre 5, le modèle transgénique E μ -TCL1 développe une hyperplasie clonale de lymphocytes B CD5⁺ et plusieurs altérations immunitaires qui s'apparentent à LLC humaine. Ce faisant, la souris transgénique E μ -TCL1 est le modèle d'étude de la LLC le plus fréquemment utilisé. Néanmoins, une récente étude rapporte une importante particularité du modèle. En effet, en compilant les résultats d'analyses de survie de plus de 150 souris par sexe, il a été démontré que les souris E μ -TCL1 mâles survivent significativement plus longtemps que les souris leucémiques femelles (922). De façon étonnante, les résultats présentés au chapitre 5 n'illustre pas une telle différence de survie entre mâles et femelles (**Figure S4.1**). Cependant, il est important de noter que cette différence de survie médiane de 37 jours (397 jours versus 360 pour les mâles et femelles respectivement) a été estimée depuis une quantité largement supérieure de souris expérimentales. Avec des cohortes plus petites, plusieurs autres études n'observent pas de telle différence de survie (922). Néanmoins, l'étude qui compile les résultats de plus de 10 cohortes de souris E μ -TCL1 de fonds génétiques différents (922) suggère que ce modèle contraste avec la LLC humaine qui est associée à une progression plus sévère chez l'homme, tel que discuté au chapitre 1.3. Par ailleurs, les résultats présentés au chapitre 4 suggère un contrôle anti-tumoral augmenté dans les souris E μ -TCL1 CD73^{-/-} mâles qui est indépendant de la régulation hormonale (**Figure S4.4**). Néanmoins, il est possible que le nombre de souris utilisé (n=8–12) soit trop faible pour observer un effet de l'ablation chirurgicale des gonades sur la progression de la LLC murine dans ce modèle.

6.13.3 L'altération génétique de CD73 chez la souris et l'humain

Beaucoup de connaissances relatives à l'axe adénosinergique sont issues des modèles murins, dont les souris CD73^{-/-}. L'identification et l'étude d'humains déficients pour l'enzyme CD73 suggèrent néanmoins que ces modèles ne sont pas parfaits (923). En effet, tel que discuté à

la section 1.1.4, les patients mutés et déficients pour CD73 sont atteints de ACDC qui est caractérisé par une importante calcification articulaire et vasculaire périphérique en partie expliquée par une augmentation compensatoire de l'activité de TNAP, ainsi que par un élargissement et une complexification des artères (29, 193). Alors que les souris CD73^{-/-} présentent un environnement sérique pro-minéralisant, celles-ci ne reproduisent que la calcification articulaire, mais pas les perturbations vasculaires observées chez les patients atteints d'ACDC (923, 924). Une différence physiologique notable qui pourrait expliquer cette disparité phénotypique entre souris et humains réside dans la cinétique de production et d'élimination de l'adénosine. En effet, alors que le temps de demi-vie de l'adénosine est de 15 secondes dans le sang humain, celle-ci est d'environ 2 minutes dans les souris (923, 925), probablement dû au fait que les souris sont dépourvues du gène encodant pour l'adénosine désaminase 2 (ADA2) (923). Malgré tout, les souris CD73^{-/-} se sont montrées particulièrement utiles dans le développement de thérapies anti-cancéreuses ciblant l'axe adénosinergique, dont plusieurs font l'objet d'études cliniques actuelles et prometteuses (6).

6.13.4 Les limitations des études métaboliques *in vitro*

Le métabolisme cellulaire étudié *in vitro* tel qu'au chapitre 5 de cette thèse ne reflète pas toutes les particularités qui peuvent être observées dans un système plus complexe. Notamment, en plus de la concentration non-physiologique des nutriments telle que discutée à la section 6.11, seulement une faible proportion de métabolites identifiés dans la circulation sanguine humaine, qui sont susceptible d'influencer l'activité métabolique, se retrouve dans la plupart des milieux de culture traditionnels. Par exemple, le glutathion qui absent des milieux de culture traditionnel peut être utiliser comme source de cystéine par certaines cellules cancéreuses (926). De plus, la culture cellulaire en monocouche représente mal le contexte tumoral *in vivo* où certaines cellules sont soumises à différentes conditions environnementales selon leur emplacement organisationnel. En effet, des différences métaboliques ont été rapportées entre les cultures *in vitro* 2D et 3D (927). Plusieurs facteurs, dont les interactions entre cellules et l'exposition à des teneurs variables en oxygène et en nutriments peuvent expliquer ces différences. Une autre considération importante à l'étude du métabolisme cellulaire réside dans l'hétérogénéité des dépendances métaboliques à l'intérieure d'une population donnée de cellules cancéreuses. En effet, les besoins énergétiques peuvent varier en fonction des stades d'initiation, de progression et de dissémination métastatique

des cellules cancéreuses (928). L'identification de vulnérabilités métaboliques des cellules métastatiques ou pré-métastatiques est d'ailleurs d'un grand intérêt dans le domaine du métabolisme cellulaire cancéreux (928). Finalement, des études ont rapporté un rôle important des cellules avoisinantes dans l'activité métabolique des cellules cancéreuses. En effet, en plus de rivaliser pour certains nutriments, différentes populations cellulaires dans un même environnement peuvent coopérer métaboliquement. Par exemple, il a été décrit que des fibroblastes pouvaient alimenter les cellules cancéreuses en glutamine et aider à l'activité métabolique de celles-ci (929). L'intégration de ces considérations à l'étude présentée au chapitre 5 de cette thèse pourrait aider à mieux comprendre l'étendu du rôle de CD73 dans la régulation métabolique des cellules cancéreuses.

6.14 Conclusion générale de la thèse

Outre les chirurgies pratiquées pendant plusieurs siècles faites d'alternatives thérapeutiques, la thérapie du cancer a connue 4 importantes révolutions depuis le début du 20^e siècle : la radiothérapie, la chimiothérapie, les thérapies ciblées et l'immunothérapie (930-932). En s'inscrivant dans la continuité de l'identification et la validation de nouvelles immunothérapies, cette thèse approfondie nos connaissances quant à l'étendu des fonctions immunologiques de l'axe adénosinergique. Les projets présentés aux chapitres 3 et 4 décrivent le potentiel thérapeutique de cibler la signalisation adénosinergique dans le but d'améliorer l'immunisation dépendante des cellules B (chapitre 3) d'une part et de retarder la progression de la LLC (chapitre 4) d'autre part.

Finalement, l'étude du métabolisme cellulaire en cancer est un domaine effervescent et est le sujet d'un nombre grandissant d'essais précliniques et de thérapies anti-cancéreuses potentielles. Le projet présenté au chapitre 5 de cette thèse décrit une fonction préalablement inconnue de CD73 dans la régulation métabolique des cellules cancéreuses consistante avec son rôle pro-tumorigénique déjà apprécié. En décrivant l'exploration de plusieurs hypothèses liées à l'activité enzymatique de CD73 supportées par la littérature, cette thèse approfondie les connaissances concernant la biologie de CD73, encore largement incomprise, dans la voie enzymatique de récupération du nicotinamide. Alors que les hypothèses liées à l'adénosine et au nicotinamide ne sont pas mutuellement exclusives, cette thèse ne rapporte aucune observation consistante avec un rôle, du moins *in vitro*, de l'adénosine dans la régulation du métabolisme des cellules cancéreuses

du TNBC. Il n'est pas impossible toutefois que les voies de production d'adénosine et du nicotinamide riboside diffèrent dans d'autres contextes expérimentaux, notamment *in vivo*, et qu'elles contribuent conjointement ou indépendamment à la régulation de l'activité métabolique de d'autres types de cellulaires. Enfin, via l'aspect novateur des résultats présentés, cette thèse ouvre la porte à de nouvelles avenues de recherches qui pourront contribuer à maximiser notre emprise sur le potentiel thérapeutique que renferme l'inhibition ciblée de l'enzyme CD73 en cancer.

Bibliographie

1. Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, De Marchi E, Suski JM, Bononi A, et al. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal*. 2012;8(3):343-57.
2. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. 1970. *Br J Pharmacol*. 1997;120(4 Suppl):337-57; discussion 4-6.
3. Lazarowski ER, Sesma JI, Seminario-Vidal L, Kreda SM. Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. *Adv Pharmacol*. 2011;61:221-61.
4. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:51-72.
5. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, et al. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*. 2010;467(7317):863-7.
6. Allard B, Allard D, Buisseret L, Stagg J. The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(10):611-29.
7. Street SE, Kramer NJ, Walsh PL, Taylor-Blake B, Yadav MC, King IF, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase acts redundantly with PAP and NT5E to generate adenosine in the dorsal spinal cord. *J Neurosci*. 2013;33(27):11314-22.
8. Donaldson SH, Picher M, Boucher RC. Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(2):209-15.
9. Yegutkin GG, Henttinen T, Samburski SS, Spsychala J, Jalkanen S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J*. 2002;367(Pt 1):121-8.
10. Allard B, Beavis PA, Darcy PK, Stagg J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;29:7-16.
11. Horenstein AL, Chillemi A, Zaccarello G, Bruzzone S, Quarona V, Zito A, et al. A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology*. 2013;2(9):e26246.
12. Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, De Flora A. Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J*. 2001;15(1):10-2.
13. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(3):166-76.
14. Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 2010;29(39):5346-58.
15. Khakh BS, North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. 2006;442(7102):527-32.
16. Fredholm BB, AP II, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev*. 2011;63(1):1-34.
17. Moser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol*. 1989;256(4 Pt 1):C799-806.
18. Yang D, Yaguchi T, Nakano T, Nishizaki T. Adenosine-induced caspase-3 activation by tuning Bcl-XL/DIABLO/IAP expression in HuH-7 human hepatoma cells. *Cell Biol Toxicol*. 2010;26(4):319-30.
19. Yang D, Yaguchi T, Yamamoto H, Nishizaki T. Intracellularly transported adenosine induces apoptosis in HuH-7 human hepatoma cells by downregulating c-FLIP expression causing caspase-3/-8 activation. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(10):1665-75.
20. Tsuchiya A, Kanno T, Saito M, Miyoshi Y, Gotoh A, Nakano T, et al. Intracellularly transported adenosine induces apoptosis in [corrected] MCF-7 human breast cancer cells by accumulating AMID in the nucleus. *Cancer Lett*. 2012;321(1):65-72.
21. Camici M, Garcia-Gil M, Tozzi MG. The Inside Story of Adenosine. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).
22. He B, Hoang TK, Wang T, Ferris M, Taylor CM, Tian X, et al. Resetting microbiota by *Lactobacillus reuteri* inhibits T reg deficiency-induced autoimmunity via adenosine A2A receptors. *J Exp Med*. 2017;214(1):107-23.
23. Welihinda AA, Kaur M, Greene K, Zhai Y, Amento EP. The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A2A receptor with a unique signaling bias. *Cell Signal*. 2016;28(6):552-60.

24. Phillips E, Newsholme EA. Maximum activities, properties and distribution of 5' nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in rat and human brain. *J Neurochem.* 1979;33(2):553-8.
25. Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 2001;79(3):463-84.
26. Wolberg G, Zimmerman TP, Hiemstra K, Winston M, Chu LC. Adenosine inhibition of lymphocyte-mediated cytotoxicity: possible role of cyclic adenosine monophosphate. *Science.* 1975;187(4180):957-9.
27. Allard D, Chrobak P, Allard B, Messaoudi N, Stagg J. Targeting the CD73-adenosine axis in immunoncology. *Immunol Lett.* 2019;205:31-9.
28. Berwick ZC, Payne GA, Lynch B, Dick GM, Sturek M, Tune JD. Contribution of adenosine A(2A) and A(2B) receptors to ischemic coronary dilation: role of K(V) and K(ATP) channels. *Microcirculation.* 2010;17(8):600-7.
29. Jin H, St Hilaire C, Huang Y, Yang D, Dmitrieva NI, Negro A, et al. Increased activity of TNAP compensates for reduced adenosine production and promotes ectopic calcification in the genetic disease ACDC. *Sci Signal.* 2016;9(458):ra121.
30. Liu H, Zhang Y, Wu H, D'Alessandro A, Yegutkin GG, Song A, et al. Beneficial Role of Erythrocyte Adenosine A2B Receptor-Mediated AMP-Activated Protein Kinase Activation in High-Altitude Hypoxia. *Circulation.* 2016;134(5):405-21.
31. Song A, Zhang Y, Han L, Yegutkin GG, Liu H, Sun K, et al. Erythrocytes retain hypoxic adenosine response for faster acclimatization upon re-ascent. *Nat Commun.* 2017;8:14108.
32. Sung SJ, Li L, Huang L, Lawler J, Ye H, Rosin DL, et al. Proximal Tubule CD73 Is Critical in Renal Ischemia-Reperfusion Injury Protection. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(3):888-902.
33. Kao DJ, Saeedi BJ, Kitzenberg D, Burney KM, Dobrinskikh E, Battista KD, et al. Intestinal Epithelial Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Regulates Intestinal Colonization and Infection by Nontyphoidal Salmonella. *Infect Immun.* 2017;85(10).
34. Aherne CM, Saeedi B, Collins CB, Masterson JC, McNamee EN, Perrenoud L, et al. Epithelial-specific A2B adenosine receptor signaling protects the colonic epithelial barrier during acute colitis. *Mucosal Immunol.* 2015;8(6):1324-38.
35. Kurtz CC, Drygiannakis I, Naganuma M, Feldman S, Bekiaris V, Linden J, et al. Extracellular adenosine regulates colitis through effects on lymphoid and nonlymphoid cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307(3):G338-46.
36. Cai Y, Li H, Liu M, Pei Y, Zheng J, Zhou J, et al. Disruption of adenosine 2A receptor exacerbates NAFLD through increasing inflammatory responses and SREBP1c activity. *Hepatology.* 2018;68(1):48-61.
37. Zhou J, Li H, Cai Y, Ma L, Mathews D, Lu B, et al. Mice lacking adenosine 2A receptor reveal increased severity of MCD-induced NASH. *J Endocrinol.* 2019.
38. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest.* 2002;110(7):993-1002.
39. Csoka B, Toro G, Vindeirinho J, Varga ZV, Koscsó B, Nemeth ZH, et al. A2A adenosine receptors control pancreatic dysfunction in high-fat-diet-induced obesity. *FASEB J.* 2017;31(11):4985-97.
40. Mediero A, Wilder T, Shah L, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor (A2AR) stimulation modulates expression of semaphorins 4D and 3A, regulators of bone homeostasis. *FASEB J.* 2018;32(7):3487-501.
41. Mediero A, Wilder T, Perez-Aso M, Cronstein BN. Direct or indirect stimulation of adenosine A2A receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. *FASEB J.* 2015;29(4):1577-90.
42. He W, Cronstein BN. Adenosine A1 receptor regulates osteoclast formation by altering TRAF6/TAK1 signaling. *Purinergic Signal.* 2012;8(2):327-37.
43. Shih YV, Liu M, Kwon SK, Iida M, Gong Y, Sangaj N, et al. Dysregulation of ectonucleotidase-mediated extracellular adenosine during postmenopausal bone loss. *Sci Adv.* 2019;5(8):eaax1387.
44. Takedachi M, Oohara H, Smith BJ, Iyama M, Kobashi M, Maeda K, et al. CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation. *J Cell Physiol.* 2012;227(6):2622-31.
45. Corciulo C, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine A2B receptors play an important role in bone homeostasis. *Purinergic Signal.* 2016;12(3):537-47.
46. Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9407-12.
47. Aoyama S, Kase H, Borrelli E. Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. *J Neurosci.* 2000;20(15):5848-52.

48. Kim DG, Bynoe MS. A2A Adenosine Receptor Regulates the Human Blood-Brain Barrier Permeability. *Mol Neurobiol.* 2015;52(1):664-78.
49. Niemela J, Ifergan I, Yegutkin GG, Jalkanen S, Prat A, Airas L. IFN-beta regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain barrier. *Eur J Immunol.* 2008;38(10):2718-26.
50. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One.* 2008;3(7):e2599.
51. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(10):601-18.
52. Eltzschig HK, Kohler D, Eckle T, Kong T, Robson SC, Colgan SP. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood.* 2009;113(1):224-32.
53. Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, Shannon JM, Guo X, et al. Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2alpha in pulmonary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(26):10684-9.
54. Kong T, Westerman KA, Faigle M, Eltzschig HK, Colgan SP. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J.* 2006;20(13):2242-50.
55. Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Kuhlicke J, Eltzschig HK. HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak. *Blood.* 2008;111(12):5571-80.
56. Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Nivillac NM, Coe IR, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia. *Gastroenterology.* 2009;136(2):607-18.
57. Eltzschig HK, Abdulla P, Hoffman E, Hamilton KE, Daniels D, Schonfeld C, et al. HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J Exp Med.* 2005;202(11):1493-505.
58. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Belikoff B, Schreiber TH, Sethumadhavan S, et al. Systemic oxygenation weakens the hypoxia and hypoxia inducible factor 1alpha-dependent and extracellular adenosine-mediated tumor protection. *J Mol Med (Berl).* 2014;92(12):1283-92.
59. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R, et al. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med.* 2015;7(277):277ra30.
60. Yan L, Burbiel JC, Maass A, Muller CE. Adenosine receptor agonists: from basic medicinal chemistry to clinical development. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2003;8(2):537-76.
61. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.* 2003;15(9):813-27.
62. Koszalka P, Golunska M, Urban A, Stasilojc G, Stanislawowski M, Majewski M, et al. Specific Activation of A3, A2A and A1 Adenosine Receptors in CD73-Knockout Mice Affects B16F10 Melanoma Growth, Neovascularization, Angiogenesis and Macrophage Infiltration. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151420.
63. Clark AN, Youkey R, Liu X, Jia L, Blatt R, Day YJ, et al. A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes. *Circ Res.* 2007;101(11):1130-8.
64. Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ Res.* 2003;92(5):485-92.
65. Synowitz M, Glass R, Farber K, Markovic D, Kronenberg G, Herrmann K, et al. A1 adenosine receptors in microglia control glioblastoma-host interaction. *Cancer Res.* 2006;66(17):8550-7.
66. Daniele S, Zappelli E, Natali L, Martini C, Trincavelli ML. Modulation of A1 and A2B adenosine receptor activity: a new strategy to sensitise glioblastoma stem cells to chemotherapy. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1539.
67. Saito M, Yaguchi T, Yasuda Y, Nakano T, Nishizaki T. Adenosine suppresses CW2 human colonic cancer growth by inducing apoptosis via A(1) adenosine receptors. *Cancer Lett.* 2010;290(2):211-5.
68. Ni S, Wei Q, Yang L. ADORA1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression via PI3K/AKT Pathway. *Onco Targets Ther.* 2020;13:12409-19.
69. Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, et al. RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(12):1355-60.
70. Lin Z, Yin P, Reierstad S, O'Halloran M, Coon VJ, Pearson EK, et al. Adenosine A1 receptor, a target and regulator of estrogen receptoralpha action, mediates the proliferative effects of estradiol in breast cancer. *Oncogene.* 2010;29(8):1114-22.
71. Kim SG, Ravi G, Hoffmann C, Jung YJ, Kim M, Chen A, et al. p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, Cl-IB-MECA. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(5):871-80.
72. Morello S, Sorrentino R, Porta A, Forte G, Popolo A, Petrella A, et al. Cl-IB-MECA enhances TRAIL-induced apoptosis via the modulation of NF-kappaB signalling pathway in thyroid cancer cells. *J Cell Physiol.* 2009;221(2):378-86.

73. Mlejnek P, Dolezel P, Kosztyu P. P-glycoprotein mediates resistance to A3 adenosine receptor agonist 2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-n-methyluronamide in human leukemia cells. *J Cell Physiol.* 2012;227(2):676-85.
74. Cohen S, Stemmer SM, Zozulya G, Ochaion A, Patoka R, Barer F, et al. CF102 an A3 adenosine receptor agonist mediates anti-tumor and anti-inflammatory effects in the liver. *J Cell Physiol.* 2011;226(9):2438-47.
75. Wen LT, Knowles AF. Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor. *Br J Pharmacol.* 2003;140(6):1009-18.
76. Aghaei M, Karami-Tehrani F, Panjehpour M, Salami S, Fallahian F. Adenosine induces cell-cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines, LNCap-FGC-10, DU-145, and PC3. *Prostate.* 2012;72(4):361-75.
77. Aghaei M, Panjehpour M, Karami-Tehrani F, Salami S. Molecular mechanisms of A3 adenosine receptor-induced G1 cell cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and independent prostate cancer cell lines: involvement of intrinsic pathway. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(10):1511-23.
78. Kanno T, Nakano T, Fujita Y, Gotoh A, Nishizaki T. Adenosine induces apoptosis in SBC-3 human lung cancer cells through A(3) adenosine receptor-dependent AMID upregulation. *Cell Physiol Biochem.* 2012;30(3):666-77.
79. Otsuki T, Kanno T, Fujita Y, Tabata C, Fukuoka K, Nakano T, et al. A3 adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in Lu-65 human lung cancer cells. *Cell Physiol Biochem.* 2012;30(1):210-20.
80. Kanno T, Gotoh A, Fujita Y, Nakano T, Nishizaki T. A(3) adenosine receptor mediates apoptosis in 5637 human bladder cancer cells by G(q) protein/PKC-dependent AIF upregulation. *Cell Physiol Biochem.* 2012;30(5):1159-68.
81. Nagaya H, Gotoh A, Kanno T, Nishizaki T. A3 adenosine receptor mediates apoptosis in in vitro RCC4-VHL human renal cancer cells by up-regulating AMID expression. *J Urol.* 2013;189(1):321-8.
82. Panjehpour M, Karami-Tehrani F. An adenosine analog (IB-MECA) inhibits anchorage-dependent cell growth of various human breast cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1502-9.
83. Panjehpour M, Karami-Tehrani F. Adenosine modulates cell growth in the human breast cancer cells via adenosine receptors. *Oncol Res.* 2007;16(12):575-85.
84. Lu J, Pierron A, Ravid K. An adenosine analogue, IB-MECA, down-regulates estrogen receptor alpha and suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 2003;63(19):6413-23.
85. Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz KN, et al. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2002;119(4):923-33.
86. Madi L, Bar-Yehuda S, Barer F, Ardon E, Ochaion A, Fishman P. A3 adenosine receptor activation in melanoma cells: association between receptor fate and tumor growth inhibition. *J Biol Chem.* 2003;278(43):42121-30.
87. Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, et al. A3 adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells. *J Biol Chem.* 2005;280(20):19516-26.
88. Fishman P, Bar-Yehuda S, Ohana G, Barer F, Ochaion A, Erlanger A, et al. An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 beta and NF-kappa B. *Oncogene.* 2004;23(14):2465-71.
89. Fishman P, Madi L, Bar-Yehuda S, Barer F, Del Valle L, Khalili K. Evidence for involvement of Wnt signaling pathway in IB-MECA mediated suppression of melanoma cells. *Oncogene.* 2002;21(25):4060-4.
90. Ohana G, Bar-Yehuda S, Arich A, Madi L, Dreznick Z, Rath-Wolfson L, et al. Inhibition of primary colon carcinoma growth and liver metastasis by the A3 adenosine receptor agonist CF101. *Br J Cancer.* 2003;89(8):1552-8.
91. Fishman P, Bar-Yehuda S, Ohana G, Pathak S, Wasserman L, Barer F, et al. Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the A3 adenosine receptor. *Eur J Cancer.* 2000;36(11):1452-8.
92. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science.* 2006;314(5806):1792-5.
93. Gao ZG, Jacobson KA. Purinergic Signaling in Mast Cell Degranulation and Asthma. *Front Pharmacol.* 2017;8:947.
94. Allard D, Turcotte M, Stagg J. Targeting A2 adenosine receptors in cancer. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(4):333-9.
95. Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(7):651-62.
96. Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL, Nadler LM. Maintenance of human T cell energy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science.* 1997;278(5335):124-8.

97. Vang AG, Housley W, Dong H, Basole C, Ben-Sasson SZ, Kream BE, et al. Regulatory T-cells and cAMP suppress effector T-cells independently of PKA-CREM/ICER: a potential role for Epac. *Biochem J.* 2013;456(3):463-73.
98. Ring S, Pushkarevskaya A, Schild H, Probst HC, Jendrossek V, Wirsdorfer F, et al. Regulatory T cell-derived adenosine induces dendritic cell migration through the Epac-Rap1 pathway. *J Immunol.* 2015;194(8):3735-44.
99. Feng W, Song Y, Chen C, Lu ZZ, Zhang Y. Stimulation of adenosine A(2B) receptors induces interleukin-6 secretion in cardiac fibroblasts via the PKC-delta-P38 signalling pathway. *Br J Pharmacol.* 2010;159(8):1598-607.
100. Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I, Feoktistov I. Cross-talk between G(s)- and G(q)-coupled pathways in regulation of interleukin-4 by A(2B) adenosine receptors in human mast cells. *Mol Pharmacol.* 2006;70(2):727-35.
101. Moriyama K, Sitkovsky MV. Adenosine A2A receptor is involved in cell surface expression of A2B receptor. *J Biol Chem.* 2010;285(50):39271-88.
102. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* 2001;414(6866):916-20.
103. Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol.* 2005;174(2):1073-80.
104. Linnemann C, Schildberg FA, Schurich A, Diehl L, Hegenbarth SI, Endl E, et al. Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. *Immunology.* 2009;128(1 Suppl):e728-37.
105. Zhang H, Conrad DM, Butler JJ, Zhao C, Blay J, Hoskin DW. Adenosine acts through A2 receptors to inhibit IL-2-induced tyrosine phosphorylation of STAT5 in T lymphocytes: role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and phosphatases. *J Immunol.* 2004;173(2):932-44.
106. Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood.* 1997;90(4):1600-10.
107. Sorrentino C, Hossain F, Rodriguez PC, Sierra RA, Pannuti A, Osborne BA, et al. Adenosine A2A Receptor Stimulation Inhibits TCR-Induced Notch1 Activation in CD8+T-Cells. *Front Immunol.* 2019;10:162.
108. Mastelic-Gavillet B, Navarro Rodrigo B, Decombaz L, Wang H, Ercolano G, Ahmed R, et al. Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8(+) T cells. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):257.
109. Raskovalova T, Lokshin A, Huang X, Su Y, Mandic M, Zarour HM, et al. Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling. *Cancer Res.* 2007;67(12):5949-56.
110. Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Huls S, Burghoff S, Schrader J. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301(2):C530-9.
111. Csoka B, Himer L, Selmezy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C, et al. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J.* 2008;22(10):3491-9.
112. Leone RD, Sun IM, Oh MH, Sun IH, Wen J, Englert J, et al. Inhibition of the adenosine A2a receptor modulates expression of T cell coinhibitory receptors and improves effector function for enhanced checkpoint blockade and ACT in murine cancer models. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(8):1271-84.
113. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol.* 2012;3:190.
114. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 2008;111(1):251-9.
115. Allard B, Pommey S, Smyth MJ, Stagg J. Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res.* 2013;19(20):5626-35.
116. Ehrentraut H, Westrich JA, Eltzschig HK, Clambey ET. Adora2b adenosine receptor engagement enhances regulatory T cell abundance during endotoxin-induced pulmonary inflammation. *PLoS One.* 2012;7(2):e32416.
117. Nakatsukasa H, Tsukimoto M, Harada H, Kojima S. Adenosine A2B receptor antagonist suppresses differentiation to regulatory T cells without suppressing activation of T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409(1):114-9.
118. Kinsey GR, Huang L, Jaworska K, Khutsishvili K, Becker DA, Ye H, et al. Autocrine adenosine signaling promotes regulatory T cell-mediated renal protection. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(9):1528-37.
119. Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WW, Reth M, Brummer T. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):31-41.

120. Young A, Ngiow SF, Gao Y, Patch AM, Barkauskas DS, Messaoudene M, et al. A2AR Adenosine Signaling Suppresses Natural Killer Cell Maturation in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 2018;78(4):1003-16.
121. Raskovalova T, Lokshin A, Huang X, Jackson EK, Gorelik E. Adenosine-mediated inhibition of cytotoxic activity and cytokine production by IL-2/NKp46-activated NK cells: involvement of protein kinase A isozyme I (PKA I). *Immunol Res.* 2006;36(1-3):91-9.
122. Raskovalova T, Huang X, Sitkovsky M, Zacharia LC, Jackson EK, Gorelik E. Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J Immunol.* 2005;175(7):4383-91.
123. Csoka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Nemeth ZH, Pacher P, Murray PJ, et al. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB J.* 2012;26(1):376-86.
124. Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Cronstein BN, Hasko G, Outram S, et al. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Ralpha) signaling. *Inflammation.* 2013;36(4):921-31.
125. Wilson JM, Ross WG, Agbai ON, Frazier R, Figler RA, Rieger J, et al. The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J Immunol.* 2009;182(8):4616-23.
126. Ben Addi A, Lefort A, Hua X, Libert F, Communi D, Ledent C, et al. Modulation of murine dendritic cell function by adenine nucleotides and adenosine: involvement of the A(2B) receptor. *Eur J Immunol.* 2008;38(6):1610-20.
127. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood.* 2008;112(5):1822-31.
128. Challier J, Bruniquel D, Sewell AK, Laugel B. Adenosine and cAMP signalling skew human dendritic cell differentiation towards a tolerogenic phenotype with defective CD8(+) T-cell priming capacity. *Immunology.* 2013;138(4):402-10.
129. Fang M, Xia J, Wu X, Kong H, Wang H, Xie W, et al. Adenosine signaling inhibits CIITA-mediated MHC class II transactivation in lung fibroblast cells. *Eur J Immunol.* 2013;43(8):2162-73.
130. Xia J, Fang M, Wu X, Yang Y, Yu L, Xu H, et al. A2b adenosine signaling represses CIITA transcription via an epigenetic mechanism in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1849(6):665-76.
131. Ryzhov S, Novitskiy SV, Goldstein AE, Biktasova A, Blackburn MR, Biaggioni I, et al. Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells. *J Immunol.* 2011;187(11):6120-9.
132. Sorrentino C, Miele L, Porta A, Pinto A, Morello S. Myeloid-derived suppressor cells contribute to A2B adenosine receptor-induced VEGF production and angiogenesis in a mouse melanoma model. *Oncotarget.* 2015;6(29):27478-89.
133. Cekic C, Day YJ, Sag D, Linden J. Myeloid expression of adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2014;74(24):7250-9.
134. Yago T, Tsukamoto H, Liu Z, Wang Y, Thompson LF, McEver RP. Multi-Inhibitory Effects of A2A Adenosine Receptor Signaling on Neutrophil Adhesion Under Flow. *J Immunol.* 2015;195(8):3880-9.
135. Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I. Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996;354(3):262-7.
136. Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J, Flament S. Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2009;21(4):977-81.
137. Shi L, Wu Z, Miao J, Du S, Ai S, Xu E, et al. Adenosine interaction with adenosine receptor A2a promotes gastric cancer metastasis by enhancing PI3K-AKT-mTOR signaling. *Mol Biol Cell.* 2019;30(19):2527-34.
138. Ma XL, Shen MN, Hu B, Wang BL, Yang WJ, Lv LH, et al. CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110beta and predicts poor prognosis. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):37.
139. Zhou Y, Chu X, Deng F, Tong L, Tong G, Yi Y, et al. The adenosine A2b receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway. *Oncotarget.* 2017;8(30):48755-68.
140. Cekic C, Sag D, Li Y, Theodorescu D, Strieter RM, Linden J. Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. *J Immunol.* 2012;188(1):198-205.
141. Kasama H, Sakamoto Y, Kasamatsu A, Okamoto A, Koyama T, Minakawa Y, et al. Adenosine A2b receptor promotes progression of human oral cancer. *BMC Cancer.* 2015;15:563.
142. Fernandez-Gallardo M, Gonzalez-Ramirez R, Sandoval A, Felix R, Monjaraz E. Adenosine Stimulate Proliferation and Migration in Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167445.

143. Ma DF, Kondo T, Nakazawa T, Niu DF, Mochizuki K, Kawasaki T, et al. Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells. *Hum Pathol.* 2010;41(11):1550-7.
144. Wei Q, Costanzi S, Balasubramanian R, Gao ZG, Jacobson KA. A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. *Purinergic Signal.* 2013;9(2):271-80.
145. Yi Y, Zhou Y, Chu X, Zheng X, Fei D, Lei J, et al. Blockade of Adenosine A2b Receptor Reduces Tumor Growth and Migration in Renal Cell Carcinoma. *J Cancer.* 2020;11(2):421-31.
146. Desmet CJ, Gallenne T, Prieur A, Reyat F, Visser NL, Wittner BS, et al. Identification of a pharmacologically tractable Fra-1/ADORA2B axis promoting breast cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(13):5139-44.
147. Ntantie E, Gonyo P, Lorimer EL, Hauser AD, Schuld N, McAllister D, et al. An adenosine-mediated signaling pathway suppresses prenylation of the GTPase Rap1B and promotes cell scattering. *Sci Signal.* 2013;6(277):ra39.
148. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(4):1547-52.
149. Mittal D, Sinha D, Barkauskas D, Young A, Kalimutho M, Stannard K, et al. Adenosine 2B Receptor Expression on Cancer Cells Promotes Metastasis. *Cancer Res.* 2016;76(15):4372-82.
150. Hajiahmadi S, Panjehpour M, Aghaei M, Shabani M. Activation of A2b adenosine receptor regulates ovarian cancer cell growth: involvement of Bax/Bcl-2 and caspase-3. *Biochem Cell Biol.* 2015;93(4):321-9.
151. Yasuda Y, Saito M, Yamamura T, Yaguchi T, Nishizaki T. Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A(2a) adenosine receptors. *J Gastroenterol.* 2009;44(1):56-65.
152. Tamura K, Kanno T, Fujita Y, Gotoh A, Nakano T, Nishizaki T. A(2a) adenosine receptor mediates HepG2 cell apoptosis by downregulating Bcl-X(L) expression and upregulating Bid expression. *J Cell Biochem.* 2012;113(5):1766-75.
153. Long JS, Crighton D, O'Prey J, Mackay G, Zheng L, Palmer TM, et al. Extracellular adenosine sensing-a metabolic cell death priming mechanism downstream of p53. *Mol Cell.* 2013;50(3):394-406.
154. Long JS, Schoonen PM, Graczyk D, O'Prey J, Ryan KM. p73 engages A2B receptor signalling to prime cancer cells to chemotherapy-induced death. *Oncogene.* 2015;34(40):5152-62.
155. Desai A, Victor-Vega C, Gadangi S, Montesinos MC, Chu CC, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1. *Mol Pharmacol.* 2005;67(5):1406-13.
156. Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, Salzman AL, Boons GJ, et al. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *Am J Pathol.* 2003;163(2):711-21.
157. Allard B, Cousineau I, Allard D, Buisseret L, Pommey S, Chrobak P, et al. Adenosine A2a receptor promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncoimmunology.* 2019;8(8):1601481.
158. Ernens I, Bousquenaud M, Lenoir B, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine stimulates angiogenesis by up-regulating production of thrombospondin-1 by macrophages. *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):9-18.
159. Du X, Ou X, Song T, Zhang W, Cong F, Zhang S, et al. Adenosine A2B receptor stimulates angiogenesis by inducing VEGF and eNOS in human microvascular endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240(11):1472-9.
160. Ryzhov S, Novitskiy SV, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Carbone DP, Biaggioni I, et al. Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia.* 2008;10(9):987-95.
161. Takedachi M, Qu D, Ebisuno Y, Oohara H, Joachims ML, McGee ST, et al. CD73-generated adenosine restricts lymphocyte migration into draining lymph nodes. *J Immunol.* 2008;180(9):6288-96.
162. Yu M, Guo G, Huang L, Deng L, Chang CS, Achyut BR, et al. CD73 on cancer-associated fibroblasts enhanced by the A2B-mediated feedforward circuit enforces an immune checkpoint. *Nat Commun.* 2020;11(1):515.
163. Sorrentino C, Miele L, Porta A, Pinto A, Morello S. Activation of the A2B adenosine receptor in B16 melanomas induces CXCL12 expression in FAP-positive tumor stromal cells, enhancing tumor progression. *Oncotarget.* 2016;7(39):64274-88.
164. Mediavilla-Varela M, Luddy K, Noyes D, Khalil FK, Neuger AM, Soliman H, et al. Antagonism of adenosine A2A receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their growth. *Cancer Biol Ther.* 2013;14(9):860-8.
165. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(35):13132-7.

166. Ma SR, Deng WW, Liu JF, Mao L, Yu GT, Bu LL, et al. Blockade of adenosine A2A receptor enhances CD8(+) T cells response and decreases regulatory T cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2017;16(1):99.
167. Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, et al. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73+ tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(36):14711-6.
168. Young A, Mittal D, Stannard K, Yong M, Teng MW, Allard B, et al. Co-blockade of immune checkpoints and adenosine A2A receptor suppresses metastasis. *Oncoimmunology*. 2014;3(10):e958952.
169. Beavis PA, Milenkovski N, Henderson MA, John LB, Allard B, Loi S, et al. Adenosine Receptor 2A Blockade Increases the Efficacy of Anti-PD-1 through Enhanced Antitumor T-cell Responses. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(5):506-17.
170. Mittal D, Young A, Stannard K, Yong M, Teng MW, Allard B, et al. Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor. *Cancer Res*. 2014;74(14):3652-8.
171. Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S. Adenosine limits the therapeutic effectiveness of anti-CTLA4 mAb in a mouse melanoma model. *Am J Cancer Res*. 2014;4(2):172-81.
172. Chen L, Diao L, Yang Y, Yi X, Rodriguez BL, Li Y, et al. CD38-Mediated Immunosuppression as a Mechanism of Tumor Cell Escape from PD-1/PD-L1 Blockade. *Cancer Discov*. 2018;8(9):1156-75.
173. Reinhardt J, Landsberg J, Schmid-Burgk JL, Ramis BB, Bald T, Glodde N, et al. MAPK Signaling and Inflammation Link Melanoma Phenotype Switching to Induction of CD73 during Immunotherapy. *Cancer Res*. 2017;77(17):4697-709.
174. Young A, Ngiew SF, Madore J, Reinhardt J, Landsberg J, Chitsazan A, et al. Targeting Adenosine in BRAF-Mutant Melanoma Reduces Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res*. 2017;77(17):4684-96.
175. Nakamura K, Casey M, Oey H, Vari F, Stagg J, Gandhi MK, et al. Targeting an adenosine-mediated "don't eat me signal" augments anti-lymphoma immunity by anti-CD20 monoclonal antibody. *Leukemia*. 2020;34(10):2708-21.
176. Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, et al. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res*. 2010;70(6):2245-55.
177. Beavis PA, Henderson MA, Giuffrida L, Mills JK, Sek K, Cross RS, et al. Targeting the adenosine 2A receptor enhances chimeric antigen receptor T cell efficacy. *J Clin Invest*. 2017;127(3):929-41.
178. Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S. Blockade of A2b adenosine receptor reduces tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of melanoma. *Neoplasia*. 2013;15(12):1400-9.
179. Kaji W, Tanaka S, Tsukimoto M, Kojima S. Adenosine A(2B) receptor antagonist PSB603 suppresses tumor growth and metastasis by inhibiting induction of regulatory T cells. *J Toxicol Sci*. 2014;39(2):191-8.
180. DiRenzo D, Zhang K, Marubayashi S, Park A, Piovesan D, Banuelos J, et al. AB928, a dual antagonist of the A2aR and A2bR adenosine receptors, relieves adenosine-mediated immune suppression [abstract A162]. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(Suppl.).
181. Himer L, Csoka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Pocza T, Pacher P, et al. Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. *FASEB J*. 2010;24(8):2631-40.
182. Cekic C, Sag D, Day YJ, Linden J. Extracellular adenosine regulates naive T cell development and peripheral maintenance. *J Exp Med*. 2013;210(12):2693-706.
183. Cekic C, Linden J. Adenosine A2A receptors intrinsically regulate CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2014;74(24):7239-49.
184. Allard D, Allard B, Gaudreau PO, Chrobak P, Stagg J. CD73-adenosine: a next-generation target in immunoncology. *Immunotherapy*. 2016;8(2):145-63.
185. Chuang NN, Newby AC, Luzio JP. Characterization of different molecular forms of 5'-nucleotidase in normal serum and in serum from cholestatic patients and bile-duct-ligated rats. *Biochem J*. 1984;224(3):689-95.
186. Maksimow M, Kyhala L, Nieminen A, Kylanpaa L, Aalto K, Elima K, et al. Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis*. *Crit Care Med*. 2014;42(12):2556-64.
187. Martin-Satue M, Lavoie EG, Fausther M, Lecka J, Aliagas E, Kukulski F, et al. High expression and activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the male murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol*. 2010;133(6):659-68.
188. Fini C, Talamo F, Cherri S, Coli M, Floridi A, Ferrara L, et al. Biochemical and mass spectrometric characterization of soluble ecto-5'-nucleotidase from bull seminal plasma. *Biochem J*. 2003;372(Pt 2):443-51.
189. Johnson SM, Patel S, Bruckner FE, Collins DA. 5'-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38(5):391-6.
190. Klemens MR, Sherman WR, Holmberg NJ, Ruedi JM, Low MG, Thompson LF. Characterization of soluble vs membrane-bound human placental 5'-nucleotidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;172(3):1371-7.

191. Vogel M, Kowalewski H, Zimmermann H, Hooper NM, Turner AJ. Soluble low-K_m 5'-nucleotidase from electric-ray (*Torpedo marmorata*) electric organ and bovine cerebral cortex is derived from the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme by phospholipase C cleavage. *Biochem J*. 1992;284 (Pt 3):621-4.
192. Knapp K, Zebisch M, Pippel J, El-Tayeb A, Muller CE, Strater N. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure*. 2012;20(12):2161-73.
193. St Hilaire C, Ziegler SG, Markello TC, Brusco A, Groden C, Gill F, et al. NT5E mutations and arterial calcifications. *N Engl J Med*. 2011;364(5):432-42.
194. Fausther M, Lavoie EG, Goree JR, Baldini G, Dranoff JA. NT5E mutations that cause human disease are associated with intracellular mistrafficking of NT5E protein. *PLoS One*. 2014;9(6):e98568.
195. Sim GC, Martin-Orozco N, Jin L, Yang Y, Wu S, Washington E, et al. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS⁺ Treg expansion in melanoma patients. *J Clin Invest*. 2014;124(1):99-110.
196. Barjon C, Michaud HA, Fages A, Dejou C, Zampieri A, They L, et al. IL-21 promotes the development of a CD73-positive Vγ9Vδ2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology*. 2017;7(1):e1379642.
197. Christensen LD, Andersen V, Nygaard P, Bendtzen K. Effects of immunomodulators on ecto-5'-nucleotidase activity on blood mononuclear cells in vitro. *Scand J Immunol*. 1992;35(4):407-13.
198. Niemela J, Henttinen T, Yegutkin GG, Airas L, Kujari AM, Rajala P, et al. IFN-α induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J Immunol*. 2004;172(3):1646-53.
199. Kiss J, Yegutkin GG, Koskinen K, Savunen T, Jalkanen S, Salmi M. IFN-β protects from vascular leakage via up-regulation of CD73. *Eur J Immunol*. 2007;37(12):3334-8.
200. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, Hichami A, et al. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity*. 2012;36(3):362-73.
201. Thibaudin M, Chaix M, Boidot R, Vegran F, Derangere V, Limagne E, et al. Human ectonucleotidase-expressing CD25(high) Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1055444.
202. Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, Cobbold SP, et al. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-β. *Eur J Immunol*. 2011;41(10):2955-65.
203. Ryzhov SV, Pickup MW, Chytil A, Gorska AE, Zhang Q, Owens P, et al. Role of TGF-β signaling in generation of CD39⁺CD73⁺ myeloid cells in tumors. *J Immunol*. 2014;193(6):3155-64.
204. Spychala J, Kitajewski J. Wnt and beta-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. *Exp Cell Res*. 2004;296(2):99-108.
205. Griesing S, Liao BC, Yang JC. CD73 Is Regulated by the EGFR-ERK Signaling Pathway in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 2021;41(3):1231-42.
206. Nevedomskaya E, Perryman R, Solanki S, Syed N, Mayboroda OA, Keun HC. A Systems Oncology Approach Identifies NT5E as a Key Metabolic Regulator in Tumor Cells and Modulator of Platinum Sensitivity. *J Proteome Res*. 2016;15(1):280-90.
207. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(27):11091-6.
208. Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A, Mitchell BS. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(2):708-17.
209. Lawrence RT, Perez EM, Hernandez D, Miller CP, Haas KM, Irie HY, et al. The proteomic landscape of triple-negative breast cancer. *Cell Rep*. 2015;11(4):630-44.
210. Sunaga N, Shames DS, Girard L, Peyton M, Larsen JE, Imai H, et al. Knockdown of oncogenic KRAS in non-small cell lung cancers suppresses tumor growth and sensitizes tumor cells to targeted therapy. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(2):336-46.
211. Inoue Y, Yoshimura K, Kurabe N, Kahyo T, Kawase A, Tanahashi M, et al. Prognostic impact of CD73 and A2A adenosine receptor expression in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(5):8738-51.
212. Rao S, Yang H, Penninger JM, Kroemer G. Autophagy in non-small cell lung carcinogenesis: A positive regulator of antitumor immunosurveillance. *Autophagy*. 2014;10(3):529-31.
213. Udyavar A, DiRenzo D, Piovesan D, Ashok D, Anderson A, Young S, et al. Altered pan-Ras pathway and activating mutations in EGFR result in elevated CD73 in multiple cancers [Abstract 2526]. AACR; Atlanta2019.
214. Narravula S, Lennon PF, Mueller BU, Colgan SP. Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function. *J Immunol*. 2000;165(9):5262-8.

215. Bao R, Shui X, Hou J, Li J, Deng X, Zhu X, et al. Adenosine and the adenosine A2A receptor agonist, CGS21680, upregulate CD39 and CD73 expression through E2F-1 and CREB in regulatory T cells isolated from septic mice. *Int J Mol Med*. 2016;38(3):969-75.
216. Zhu J, Zeng Y, Li W, Qin H, Lei Z, Shen D, et al. CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2017;16(1):34.
217. Xie M, Qin H, Luo Q, Huang Q, He X, Yang Z, et al. MicroRNA-30a regulates cell proliferation and tumor growth of colorectal cancer by targeting CD73. *BMC Cancer*. 2017;17(1):305.
218. Song Y, Song C, Yang S. Tumor-Suppressive Function of miR-30d-5p in Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration by Targeting NT5E. *Cancer Biother Radiopharm*. 2018;33(5):203-11.
219. Bonnin N, Armandy E, Carras J, Ferrandon S, Battiston-Montagne P, Aubry M, et al. MiR-422a promotes loco-regional recurrence by targeting NT5E/CD73 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(28):44023-38.
220. Lo Nigro C, Monteverde M, Lee S, Lattanzio L, Vivenza D, Comino A, et al. NT5E CpG island methylation is a favourable breast cancer biomarker. *Br J Cancer*. 2012;107(1):75-83.
221. Wang H, Lee S, Nigro CL, Lattanzio L, Merlano M, Monteverde M, et al. NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *Br J Cancer*. 2012;106(8):1446-52.
222. Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Moller A, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res*. 2012;72(9):2190-6.
223. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res*. 2011;71(8):2892-900.
224. Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemela J, Laurila JP, Elima K, et al. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol*. 2011;41(5):1231-41.
225. Koszalka P, Pryszlak A, Golunska M, Kolasa J, Stasiolc G, Skladanowski AC, et al. Inhibition of CD73 stimulates the migration and invasion of B16F10 melanoma cells in vitro, but results in impaired angiogenesis and reduced melanoma growth in vivo. *Oncol Rep*. 2014;31(2):819-27.
226. Wang L, Fan J, Thompson LF, Zhang Y, Shin T, Curiel TJ, et al. CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2371-82.
227. Hausler SF, Montalban del Barrio I, Strohschein J, Chandran PA, Engel JB, Honig A, et al. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(10):1405-18.
228. Hausler SF, Del Barrio IM, Diessner J, Stein RG, Strohschein J, Honig A, et al. Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion. *Am J Transl Res*. 2014;6(2):129-39.
229. Forte G, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Adcock IM, Maiolino P, et al. Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma. *J Immunol*. 2012;189(5):2226-33.
230. Turcotte M, Spring K, Pommey S, Chouinard G, Cousineau I, George J, et al. CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res*. 2015;75(21):4494-503.
231. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204(6):1257-65.
232. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7176-86.
233. Sauer AV, Brigida I, Carriglio N, Hernandez RJ, Scaramuzza S, Clavenna D, et al. Alterations in the adenosine metabolism and CD39/CD73 adenosinergic machinery cause loss of Treg cell function and autoimmunity in ADA-deficient SCID. *Blood*. 2012;119(6):1428-39.
234. Sun X, Wu Y, Gao W, Enjoji K, Csizmadia E, Muller CE, et al. CD39/ENTPD1 expression by CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology*. 2010;139(3):1030-40.
235. Maj T, Wang W, Crespo J, Zhang H, Wang W, Wei S, et al. Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nat Immunol*. 2017;18(12):1332-41.
236. Burton CT, Westrop SJ, Eccles-James I, Boasso A, Nelson MR, Bower M, et al. Altered phenotype of regulatory T cells associated with lack of human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific suppressive function. *Clin Exp Immunol*. 2011;166(2):191-200.
237. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, et al. Human CD4⁺ CD39⁺ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73⁺ exosomes or CD73⁺ cells. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(2):531-43.

238. Govindaraj C, Scalzo-Inguanti K, Madondo M, Hallo J, Flanagan K, Quinn M, et al. Impaired Th1 immunity in ovarian cancer patients is mediated by TNFR2⁺ Tregs within the tumor microenvironment. *Clin Immunol.* 2013;149(1):97-110.
239. Wang L, Tang S, Wang Y, Xu S, Yu J, Zhi X, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes tumor angiogenesis. *Clin Exp Metastasis.* 2013;30(5):671-80.
240. Allard B, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royal I, Stagg J. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2014;134(6):1466-73.
241. Sadej R, Spychala J, Skladanowski AC. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Res.* 2006;16(3):213-22.
242. Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, et al. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem.* 2008;319(1-2):61-8.
243. Braganhol E, Tamajusuku AS, Bernardi A, Wink MR, Battastini AM. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1770(9):1352-9.
244. Quezada C, Garrido W, Oyarzun C, Fernandez K, Segura R, Melo R, et al. 5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. *J Cell Physiol.* 2013;228(3):602-8.
245. Azambuja JH, Gelsleichter NE, Beckenkamp LR, Iser IC, Fernandes MC, Figueiro F, et al. CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. *Mol Neurobiol.* 2019;56(5):3260-79.
246. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
247. Anders CK, Deal AM, Miller CR, Khorram C, Meng H, Burrows E, et al. The prognostic contribution of clinical breast cancer subtype, age, and race among patients with breast cancer brain metastases. *Cancer.* 2011;117(8):1602-11.
248. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(8):1275-81.
249. Leth-Larsen R, Lund R, Hansen HV, Laenholm AV, Tarin D, Jensen ON, et al. Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(6):1436-49.
250. Lee H, Lin EC, Liu L, Smith JW. Gene expression profiling of tumor xenografts: In vivo analysis of organ-specific metastasis. *Int J Cancer.* 2003;107(4):528-34.
251. Rust S, Guillard S, Sachsenmeier K, Hay C, Davidson M, Karlsson A, et al. Combining phenotypic and proteomic approaches to identify membrane targets in a 'triple negative' breast cancer cell type. *Mol Cancer.* 2013;12:11.
252. Zhou X, Zhi X, Zhou P, Chen S, Zhao F, Shao Z, et al. Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2007;17(6):1341-6.
253. Zhi X, Wang Y, Zhou X, Yu J, Jian R, Tang S, et al. RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2010;101(12):2561-9.
254. Zhi X, Chen S, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, et al. RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(6):439-48.
255. Terp MG, Olesen KA, Arnspang EC, Lund RR, Lagerholm BC, Ditzel HJ, et al. Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. *J Immunol.* 2013;191(8):4165-73.
256. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(3):365-72.
257. Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, et al. Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(3):426-31.
258. Zhi X, Wang Y, Yu J, Yu J, Zhang L, Yin L, et al. Potential prognostic biomarker CD73 regulates epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer. *IUBMB Life.* 2012;64(11):911-20.
259. Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* 2019;29(3):212-26.
260. Petruk N, Tuominen S, Akerfelt M, Mattsson J, Sandholm J, Nees M, et al. CD73 facilitates EMT progression and promotes lung metastases in triple-negative breast cancer. *Sci Rep.* 2021;11(1):6035.
261. Turcotte M, Allard D, Mittal D, Bareche Y, Buisseret L, Jose V, et al. CD73 Promotes Resistance to HER2/ErbB2 Antibody Therapy. *Cancer Res.* 2017;77(20):5652-63.

262. Garcia-Rocha R, Monroy-Garcia A, Hernandez-Montes J, Weiss-Steider B, Gutierrez-Serrano V, Del Carmen Fuentes-Castaneda M, et al. Cervical cancer cells produce TGF-beta1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF-beta1. *Cytokine*. 2019;118:71-9.
263. Lupia M, Angiolini F, Bertalot G, Freddi S, Sachsenmeier KF, Chisci E, et al. CD73 Regulates Stemness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer-Initiating Cells. *Stem Cell Reports*. 2018;10(4):1412-25.
264. Xiong L, Wen Y, Miao X, Yang Z. NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell Tissue Res*. 2014;355(2):365-74.
265. Ma XL, Hu B, Tang WG, Xie SH, Ren N, Guo L, et al. CD73 sustained cancer-stem-cell traits by promoting SOX9 expression and stability in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):11.
266. Tsiampali J, Neumann S, Giesen B, Koch K, Maciaczyk D, Janiak C, et al. Enzymatic Activity of CD73 Modulates Invasion of Gliomas via Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Reprogramming. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;13(11).
267. Xu Z, Gu C, Yao X, Guo W, Wang H, Lin T, et al. CD73 promotes tumor metastasis by modulating RICS/RhoA signaling and EMT in gastric cancer. *Cell Death Dis*. 2020;11(3):202.
268. Lan J, Lu H, Samanta D, Salman S, Lu Y, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of adenosine receptor 2B promotes breast cancer stem cell enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(41):E9640-E8.
269. Liu TZ, Wang X, Bai YF, Liao HZ, Qiu SC, Yang YQ, et al. The HIF-2alpha dependent induction of PAP and adenosine synthesis regulates glioblastoma stem cell function through the A2B adenosine receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;49:8-16.
270. Yu J, Liao X, Li L, Lv L, Zhi X, Yu J, et al. A preliminary study of the role of extracellular -5'- nucleotidase in breast cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017;53(2):132-40.
271. Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Shimada S, Akiyama Y, Aihara A, et al. CD73 as a therapeutic target for pancreatic neuroendocrine tumor stem cells. *Int J Oncol*. 2016;48(2):657-69.
272. Song L, Ye W, Cui Y, Lu J, Zhang Y, Ding N, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is a biomarker for clear cell renal carcinoma stem-like cells. *Oncotarget*. 2017;8(19):31977-92.
273. Murata K, Tsukahara T, Emori M, Shibayama Y, Mizushima E, Matsumiya H, et al. Identification of a novel human memory T-cell population with the characteristics of stem-like chemo-resistance. *Oncoimmunology*. 2016;5(6):e1165376.
274. Sadej R, Inai K, Rajfur Z, Ostapkowicz A, Kohler J, Skladanowski AC, et al. Tenascin C interacts with ecto-5'-nucleotidase (eN) and regulates adenosine generation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782(1):35-40.
275. Sadej R, Skladanowski AC. Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim Pol*. 2012;59(4):647-52.
276. Stefanova I, Horejsi V, Ansoategui IJ, Knapp W, Stockinger H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science*. 1991;254(5034):1016-9.
277. Resta R, Thompson LF. T cell signalling through CD73. *Cell Signal*. 1997;9(2):131-9.
278. Gao ZW, Wang HP, Lin F, Wang X, Long M, Zhang HZ, et al. CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC Cancer*. 2017;17(1):135.
279. Zhou L, Jia S, Chen Y, Wang W, Wu Z, Yu W, et al. The distinct role of CD73 in the progression of pancreatic cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2019;97(6):803-15.
280. Hoskin DW, Reynolds T, Blay J. Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumours. *Int J Cancer*. 1994;59(6):854-5.
281. Blay J, White TD, Hoskin DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res*. 1997;57(13):2602-5.
282. Wennerberg E, Spada S, Rudqvist NP, Lhuillier C, Gruber S, Chen Q, et al. CD73 Blockade Promotes Dendritic Cell Infiltration of Irradiated Tumors and Tumor Rejection. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(4):465-78.
283. Chen S, Fan J, Zhang M, Qin L, Dominguez D, Long A, et al. CD73 expression on effector T cells sustained by TGF-beta facilitates tumor resistance to anti-4-1BB/CD137 therapy. *Nat Commun*. 2019;10(1):150.
284. Young A, Ngiow SF, Barkauskas DS, Sult E, Hay C, Blake SJ, et al. Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell*. 2016;30(3):391-403.
285. Elliott MR, Cheken FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 2009;461(7261):282-6.
286. Segovia M, Russo S, Jeldres M, Mahmoud YD, Perez V, Duhalde M, et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell*. 2019;35(5):767-81 e6.

287. Moreschi I, Bruzzone S, Nicholas RA, Fruscione F, Sturla L, Benvenuto F, et al. Extracellular NAD⁺ is an agonist of the human P2Y₁₁ purinergic receptor in human granulocytes. *J Biol Chem*. 2006;281(42):31419-29.
288. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, et al. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X₇ purinoceptor. *Immunity*. 2003;19(4):571-82.
289. Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, et al. Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X₇ pathway. *J Exp Med*. 2010;207(12):2561-8.
290. Allard D, Allard B, Stagg J. On the mechanism of anti-CD39 immune checkpoint therapy. *J Immunother Cancer*. 2020;8(1).
291. Hammami A, Allard D, Allard B, Stagg J. Targeting the adenosine pathway for cancer immunotherapy. *Semin Immunol*. 2019;42:101304.
292. Park YJ, Ryu H, Choi G, Kim BS, Hwang ES, Kim HS, et al. IL-27 confers a protumorigenic activity of regulatory T cells via CD39. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(8):3106-11.
293. Peres RS, Donate PB, Talbot J, Cecilio NT, Lobo PR, Machado CC, et al. TGF-beta signalling defect is linked to low CD39 expression on regulatory T cells and methotrexate resistance in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2018;90:49-58.
294. Takenaka MC, Gabriely G, Rothhammer V, Mascanfroni ID, Wheeler MA, Chao CC, et al. Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. *Nat Neurosci*. 2019;22(5):729-40.
295. Lee HC. Structure and enzymatic functions of human CD38. *Mol Med*. 2006;12(11-12):317-23.
296. Dwivedi S, Rendon-Huerta EP, Ortiz-Navarrete V, Montano LF. CD38 and Regulation of the Immune Response Cells in Cancer. *J Oncol*. 2021;2021:6630295.
297. Deshpande DA, Walseth TF, Panettieri RA, Kannan MS. CD38/cyclic ADP-ribose-mediated Ca²⁺ signaling contributes to airway smooth muscle hyper-responsiveness. *FASEB J*. 2003;17(3):452-4.
298. Liu Y, Guo Y, Huang W, Deng KY, Qian Y, Xin HB. 17beta-Estradiol Promotes Apoptosis in Airway Smooth Muscle Cells Through CD38/SIRT1/p53 Pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:770.
299. Patton DT, Wilson MD, Rowan WC, Soond DR, Okkenhaug K. The PI3K p110delta regulates expression of CD38 on regulatory T cells. *PLoS One*. 2011;6(3):e17359.
300. Covarrubias AJ, Kale A, Perrone R, Lopez-Dominguez JA, Pisco AO, Kasler HG, et al. Senescent cells promote tissue NAD(+) decline during ageing via the activation of CD38(+) macrophages. *Nat Metab*. 2020;2(11):1265-83.
301. Smith G. Mitozantrone--out of the blue. *Aust Nurses J*. 1989;18(8):28.
302. Chini CCS, Peclat TR, Warner GM, Kashyap S, Espindola-Netto JM, de Oliveira GC, et al. CD38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates NAD(+) and NMN levels. *Nat Metab*. 2020;2(11):1284-304.
303. Kunzli BM, Bernlochner MI, Rath S, Kaser S, Csizmadia E, Enjyoji K, et al. Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. *Purinergic Signal*. 2011;7(2):231-41.
304. Zhang H, Vijayan D, Li XY, Robson SC, Geetha N, Teng MWL, et al. The role of NK cells and CD39 in the immunological control of tumor metastases. *Oncoimmunology*. 2019;8(6):e1593809.
305. Ahlmanner F, Sundstrom P, Akeus P, Eklof J, Borjesson L, Gustavsson B, et al. CD39(+) regulatory T cells accumulate in colon adenocarcinomas and display markers of increased suppressive function. *Oncotarget*. 2018;9(97):36993-7007.
306. Retseck J, Nasr A, Lin Y, Lin H, Mendiratta P, Butterfield LH, et al. Long term impact of CTLA4 blockade immunotherapy on regulatory and effector immune responses in patients with melanoma. *J Transl Med*. 2018;16(1):184.
307. Kashyap AS, Thelemann T, Klar R, Kallert SM, Festag J, Buchi M, et al. Antisense oligonucleotide targeting CD39 improves anti-tumor T cell immunity. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):67.
308. De Marchi E, Orioli E, Pegoraro A, Sangaletti S, Portararo P, Curti A, et al. The P2X₇ receptor modulates immune cells infiltration, ectonucleotidases expression and extracellular ATP levels in the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2019;38(19):3636-50.
309. Rao S, Tortola L, Perlot T, Wirnsberger G, Novatchkova M, Nitsch R, et al. A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nat Commun*. 2014;5:3056.
310. Cohen HB, Briggs KT, Marino JP, Ravid K, Robson SC, Mosser DM. TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses. *Blood*. 2013;122(11):1935-45.
311. Savio LEB, de Andrade Mello P, Figliuolo VR, de Avelar Almeida TF, Santana PT, Oliveira SDS, et al. CD39 limits P2X₇ receptor inflammatory signaling and attenuates sepsis-induced liver injury. *J Hepatol*. 2017;67(4):716-26.

312. Simoni Y, Becht E, Fehlings M, Loh CY, Koo SL, Teng KWW, et al. Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature*. 2018;557(7706):575-9.
313. Canale FP, Ramello MC, Nunez N, Araujo Furlan CL, Bossio SN, Gorosito Serran M, et al. CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8(+) T Cells. *Cancer Res*. 2018;78(1):115-28.
314. Hu X, Liu X, Moisan J, Wang Y, Lesch CA, Spooner C, et al. Synthetic RORgamma agonists regulate multiple pathways to enhance antitumor immunity. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1254854.
315. Schnurr M, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, et al. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Immunol*. 2000;165(8):4704-9.
316. Wilkin F, Duhant X, Bruyns C, Suarez-Huerta N, Boeynaems JM, Robaye B. The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2001;166(12):7172-7.
317. Li J, Wang L, Chen X, Li L, Li Y, Ping Y, et al. CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-beta-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6(6):e1320011.
318. Limagne E, Euvrard R, Thibaudin M, Rebe C, Derangere V, Chevriaux A, et al. Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX-Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer Res*. 2016;76(18):5241-52.
319. Feng L, Sun X, Csizmadia E, Han L, Bian S, Murakami T, et al. Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate. *Neoplasia*. 2011;13(3):206-16.
320. Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enjyoji K, Csizmadia E, et al. Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice. *Am J Pathol*. 2007;171(4):1395-404.
321. Goepfert C, Sundberg C, Sevigny J, Enjyoji K, Hoshi T, Csizmadia E, et al. Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice. *Circulation*. 2001;104(25):3109-15.
322. Ben Baruch B, Blacher E, Mantsur E, Schwartz H, Vaknine H, Erez N, et al. Stromal CD38 regulates outgrowth of primary melanoma and generation of spontaneous metastasis. *Oncotarget*. 2018;9(61):31797-811.
323. Favia A, Desideri M, Gambarà G, D'Alessio A, Ruas M, Esposito B, et al. VEGF-induced neoangiogenesis is mediated by NAADP and two-pore channel-2-dependent Ca²⁺ signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(44):E4706-15.
324. Bahri R, Bollinger A, Bollinger T, Orinska Z, Bulfone-Paus S. Ectonucleotidase CD38 demarcates regulatory, memory-like CD8+ T cells with IFN-gamma-mediated suppressor activities. *PLoS One*. 2012;7(9):e45234.
325. Fedele G, Frasca L, Palazzo R, Ferrero E, Malavasi F, Ausiello CM. CD38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in CD83 expression and IL-12 induction. *Eur J Immunol*. 2004;34(5):1342-50.
326. Lande R, Urbani F, Di Carlo B, Sconocchia G, Deaglio S, Funaro A, et al. CD38 ligation plays a direct role in the induction of IL-1beta, IL-6, and IL-10 secretion in resting human monocytes. *Cell Immunol*. 2002;220(1):30-8.
327. Feng X, Zhang L, Acharya C, An G, Wen K, Qiu L, et al. Targeting CD38 Suppresses Induction and Function of T Regulatory Cells to Mitigate Immunosuppression in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(15):4290-300.
328. Wang WW, Yuan XL, Chen H, Xie GH, Ma YH, Zheng YX, et al. CD19+CD24hiCD38hiBregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer. *Oncotarget*. 2015;6(32):33486-99.
329. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med*. 2013;5(173):173ra23.
330. Dominguez-Pantoja M, Lopez-Herrera G, Romero-Ramirez H, Santos-Argumedo L, Chavez-Rueda AK, Hernandez-Cueto A, et al. CD38 protein deficiency induces autoimmune characteristics and its activation enhances IL-10 production by regulatory B cells. *Scand J Immunol*. 2018;87(6):e12664.
331. Morandi F, Morandi B, Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Zaccarello G, et al. A non-canonical adenosinergic pathway led by CD38 in human melanoma cells induces suppression of T cell proliferation. *Oncotarget*. 2015;6(28):25602-18.
332. Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol*. 2011;187(2):676-83.
333. Salimu J, Webber J, Gurney M, Al-Taei S, Clayton A, Tabi Z. Dominant immunosuppression of dendritic cell function by prostate-cancer-derived exosomes. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1368823.
334. Morandi F, Marimpietri D, Horenstein AL, Bolzoni M, Toscani D, Costa F, et al. Microvesicles released from multiple myeloma cells are equipped with ectoenzymes belonging to canonical and non-canonical adenosinergic pathways and produce adenosine from ATP and NAD(). *Oncoimmunology*. 2018;7(8):e1458809.

335. Theodoraki MN, Hoffmann TK, Jackson EK, Whiteside TL. Exosomes in HNSCC plasma as surrogate markers of tumour progression and immune competence. *Clin Exp Immunol.* 2018;194(1):67-78.
336. Morandi F, Marimpietri D, Horenstein AL, Corrias MV, Malavasi F. Microvesicles expressing adenosinergic ectoenzymes and their potential role in modulating bone marrow infiltration by neuroblastoma cells. *Oncoimmunology.* 2019;8(5):e1574198.
337. Zhang F, Li R, Yang Y, Shi C, Shen Y, Lu C, et al. Specific Decrease in B-Cell-Derived Extracellular Vesicles Enhances Post-Chemotherapeutic CD8(+) T Cell Responses. *Immunity.* 2019;50(3):738-50 e7.
338. Hayes GM, Cairns B, Levashova Z, Chinn L, Perez M, Theunissen JW, et al. CD39 is a promising therapeutic antibody target for the treatment of soft tissue sarcoma. *Am J Transl Res.* 2015;7(6):1181-8.
339. Perrot I, Michaud HA, Giraudon-Paoli M, Augier S, Docquier A, Gros L, et al. Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. *Cell Rep.* 2019;27(8):2411-25 e9.
340. Li XY, Moesta AK, Xiao C, Nakamura K, Casey M, Zhang H, et al. Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity. *Cancer Discov.* 2019;9(12):1754-73.
341. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science.* 2011;334(6062):1573-7.
342. Manna A, Aulakh S, Jani P, Ahmed S, Akhtar S, Coignet M, et al. Targeting CD38 Enhances the Antileukemic Activity of Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2019;25(13):3974-85.
343. Bu X, Kato J, Hong JA, Merino MJ, Schrupp DS, Lund FE, et al. CD38 knockout suppresses tumorigenesis in mice and clonogenic growth of human lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 2018;39(2):242-51.
344. Blacher E, Ben Baruch B, Levy A, Geva N, Green KD, Garneau-Tsodikova S, et al. Inhibition of glioma progression by a newly discovered CD38 inhibitor. *Int J Cancer.* 2015;136(6):1422-33.
345. Levy A, Blacher E, Vaknine H, Lund FE, Stein R, Mayo L. CD38 deficiency in the tumor microenvironment attenuates glioma progression and modulates features of tumor-associated microglia/macrophages. *Neuro Oncol.* 2012;14(8):1037-49.
346. Sidders B, Zhang P, Goodwin K, O'Connor G, Russell DL, Borodovsky A, et al. Adenosine Signaling Is Prognostic for Cancer Outcome and Has Predictive Utility for Immunotherapeutic Response. *Clin Cancer Res.* 2020;26(9):2176-87.
347. Wu Z, Yang L, Shi L, Song H, Shi P, Yang T, et al. Prognostic Impact of Adenosine Receptor 2 (A2aR) and Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Colorectal Cancer. *Biomed Res Int.* 2019;2019:8014627.
348. Horigome E, Fujieda M, Handa T, Katayama A, Ito M, Ichihara A, et al. Mutant TP53 modulates metastasis of triple negative breast cancer through adenosine A2b receptor signaling. *Oncotarget.* 2018;9(77):34554-66.
349. Liao J, Zeng DN, Li JZ, Hua QM, Xiao Z, He C, et al. Targeting adenosinergic pathway enhances the anti-tumor efficacy of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int.* 2020;14(1):80-95.
350. Vogt TJ, Gevensleben H, Dietrich J, Kristiansen G, Bootz F, Landsberg J, et al. Detailed analysis of adenosine A2a receptor (ADORA2A) and CD73 (5'-nucleotidase, ecto, NT5E) methylation and gene expression in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oncoimmunology.* 2018;7(8):e1452579.
351. Riccardo F, Arigoni M, Buson G, Zago E, Iezzi M, Longo D, et al. Characterization of a genetic mouse model of lung cancer: a promise to identify Non-Small Cell Lung Cancer therapeutic targets and biomarkers. *BMC Genomics.* 2014;15 Suppl 3:S1.
352. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1840-7.
353. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev.* 2009;23(1):25-47.
354. Liu X, Grogan TR, Hieronymus H, Hashimoto T, Mottahedeh J, Cheng D, et al. Low CD38 Identifies Progenitor-like Inflammation-Associated Luminal Cells that Can Initiate Human Prostate Cancer and Predict Poor Outcome. *Cell Rep.* 2016;17(10):2596-606.
355. Lam JH, Ng HHM, Lim CJ, Sim XN, Malavasi F, Li H, et al. Expression of CD38 on Macrophages Predicts Improved Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Front Immunol.* 2019;10:2093.
356. Taylor SN, Sanders CV. Unusual manifestations of invasive pneumococcal infection. *Am J Med.* 1999;107(1A):12S-27S.
357. Ash SY, Sheffield JV. Pneumococcus. *Med Clin North Am.* 2013;97(4):647-66, x-xi.
358. Publication WHO. Pneumococcal vaccines WHO position paper - 2012 - recommendations. *Vaccine.* 2012;30(32):4717-8.
359. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis.* 2008;198(7):962-70.

360. Tuomanen E, Rich R, Zak O. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am Rev Respir Dis.* 1987;135(4):869-74.
361. Riesenfeld-Orn I, Wolpe S, Garcia-Bustos JF, Hoffmann MK, Tuomanen E. Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect Immun.* 1989;57(7):1890-3.
362. Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun.* 1994;62(7):2715-21.
363. Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, et al. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med.* 1990;171(2):439-48.
364. Geelen S, Bhattacharyya C, Tuomanen E. Induction of procoagulant activity on human endothelial cells by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1992;60(10):4179-83.
365. Tauber MG, Sachdeva M, Kennedy SL, Loetscher H, Lesslauer W. Toxicity in neuronal cells caused by cerebrospinal fluid from pneumococcal and gram-negative meningitis. *J Infect Dis.* 1992;166(5):1045-50.
366. Tureen JH, Dworkin RJ, Kennedy SL, Sachdeva M, Sande MA. Loss of cerebrovascular autoregulation in experimental meningitis in rabbits. *J Clin Invest.* 1990;85(2):577-81.
367. Pfister HW, Koedel U, Haberl RL, Dirnagl U, Feiden W, Ruckdeschel G, et al. Microvascular changes during the early phase of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10(6):914-22.
368. Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1991;5(11):2611-6.
369. Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol.* 1997;25(6):1113-24.
370. Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, Nanno M, Shimida S, Ohwaki M, et al. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell.* 2000;102(6):827-37.
371. Braathen R, Sandvik A, Berntzen G, Hammerschmidt S, Fleckenstein B, Sandlie I, et al. Identification of a polymeric Ig receptor binding phage-displayed peptide that exploits epithelial transcytosis without dimeric IgA competition. *J Biol Chem.* 2006;281(11):7075-81.
372. Tuomanen EI, Austrian R, Masure HR. Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med.* 1995;332(19):1280-4.
373. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(7).
374. Doerschuk CM, Tasaka S, Wang Q. CD11/CD18-dependent and -independent neutrophil emigration in the lungs: how do neutrophils know which route to take? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(2):133-6.
375. Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, et al. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol.* 2007;9(3):633-44.
376. Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG, et al. Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *J Immunol.* 2003;171(10):5380-8.
377. Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, et al. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(2):171-9.
378. Nakasone C, Yamamoto N, Nakamatsu M, Kinjo T, Miyagi K, Uezu K, et al. Accumulation of gamma/delta T cells in the lungs and their roles in neutrophil-mediated host defense against pneumococcal infection. *Microbes Infect.* 2007;9(3):251-8.
379. Kirby AC, Newton DJ, Carding SR, Kaye PM. Pulmonary dendritic cells and alveolar macrophages are regulated by gammadelta T cells during the resolution of *S. pneumoniae*-induced inflammation. *J Pathol.* 2007;212(1):29-37.
380. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, Miyagi K, Nakasone C, Uezu K, et al. Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol.* 2003;33(12):3322-30.
381. Dessing MC, Knapp S, Florquin S, de Vos AF, van der Poll T. CD14 facilitates invasive respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(6):604-11.
382. Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1992;60(1):111-6.
383. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(26):16969-74.

384. Gordon SB, Irving GR, Lawson RA, Lee ME, Read RC. Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. *Infect Immun*. 2000;68(4):2286-93.
385. Rijnveld AW, de Vos AF, Florquin S, Verbeek JS, van der Poll T. CD11b limits bacterial outgrowth and dissemination during murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*. 2005;191(10):1755-60.
386. Orihuela CJ, Mahdavi J, Thornton J, Mann B, Wooldridge KG, Abouseada N, et al. Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1638-46.
387. Uchiyama S, Carlin AF, Khosravi A, Weiman S, Banerjee A, Quach D, et al. The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J Exp Med*. 2009;206(9):1845-52.
388. Fillon S, Soulis K, Rajasekaran S, Benedict-Hamilton H, Radin JN, Orihuela CJ, et al. Platelet-activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *J Immunol*. 2006;177(9):6182-91.
389. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis*. 1985;151(5):859-68.
390. Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME. Adjunctive dexamethasone therapy for bacterial meningitis in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Neurol*. 2009;16(6):662-73.
391. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1917-24.
392. Doern GV, Brueggemann AB, Huynh H, Wingert E. Antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1997-98. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(6):757-65.
393. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009;374(9700):1543-56.
394. Centers for Disease C. Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Report Emerging Infections Program Network *Streptococcus pneumoniae*, 2018-2018 [Available from: <https://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu18.pdf>].
395. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2008;7:1.
396. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barrett NL, Pass M, Lexau C, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA*. 2001;285(13):1729-35.
397. Vila-Corcoles A, Salsench E, Rodriguez-Blanco T, Ochoa-Gondar O, de Diego C, Valdivieso A, et al. Clinical effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumonia in middle-aged and older adults: a matched case-control study. *Vaccine*. 2009;27(10):1504-10.
398. Fine MJ, Smith MA, Carson CA, Meffe F, Sankey SS, Weissfeld LA, et al. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med*. 1994;154(23):2666-77.
399. Jackson LA, Gurtman A, van Cleeff M, Jansen KU, Jayawardene D, Devlin C, et al. Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in pneumococcal vaccine-naïve adults. *Vaccine*. 2013;31(35):3577-84.
400. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis*. 2010;201(1):32-41.
401. Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis*. 2007;196(9):1346-54.
402. Ongkasuwan J, Valdez TA, Hulten KG, Mason EO, Jr., Kaplan SL. Pneumococcal mastoiditis in children and the emergence of multidrug-resistant serotype 19A isolates. *Pediatrics*. 2008;122(1):34-9.
403. Dagan R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15 Suppl 3:16-20.
404. Rosen C, Christensen P, Hovelius B, Prellner K. A longitudinal study of the nasopharyngeal carriage of pneumococci as related to pneumococcal vaccination in children attending day-care centres. *Acta Otolaryngol*. 1984;98(5-6):524-32.
405. Herva E, Luotonen J, Timonen M, Sibakov M, Karma P, Makela PH. The effect of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine on nasopharyngeal and nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Infect Dis*. 1980;12(2):97-100.
406. Centers for Disease C, Prevention. Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease--United States, 1998-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;54(36):893-7.

407. Lemma M, Bekele Y, Petkov S, Hagglund M, Petros B, Aseffa A, et al. Streptococcus pneumoniae Nasopharyngeal Carriage among PCV-10-Vaccinated HIV-1-Infected Children with Maintained Serological Memory in Ethiopia. *Pathogens*. 2020;9(3).
408. Moore MR, Hyde TB, Hennessy TW, Parks DJ, Reasonover AL, Harker-Jones M, et al. Impact of a conjugate vaccine on community-wide carriage of nonsusceptible Streptococcus pneumoniae in Alaska. *J Infect Dis*. 2004;190(11):2031-8.
409. Daniels CC, Rogers PD, Shelton CM. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2016;21(1):27-35.
410. Fedson DS, Nicolas-Spony L, Klemets P, van der Linden M, Marques A, Salleras L, et al. Pneumococcal polysaccharide vaccination for adults: new perspectives for Europe. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(8):1143-67.
411. Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(3):301-9.
412. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):871-99.
413. Baumgarth N. A Hard(y) Look at B-1 Cell Development and Function. *J Immunol*. 2017;199(10):3387-94.
414. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):34-46.
415. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*. 2005;23(1):7-18.
416. Briles DE, Claflin JL, Schroer K, Forman C. Mouse Igg3 antibodies are highly protective against infection with Streptococcus pneumoniae. *Nature*. 1981;294(5836):88-90.
417. Haas KM, Blevins MW, High KP, Pang B, Swords WE, Yammani RD. Aging promotes B-1b cell responses to native, but not protein-conjugated, pneumococcal polysaccharides: implications for vaccine protection in older adults. *J Infect Dis*. 2014;209(1):87-97.
418. McKay JT, Egan RP, Yammani RD, Chen L, Shin T, Yagita H, et al. PD-1 suppresses protective immunity to Streptococcus pneumoniae through a B cell-intrinsic mechanism. *J Immunol*. 2015;194(5):2289-99.
419. Parker AR, Skold M, Harding S, Barton JC, Bertoli LF, Barton JC. Pneumococcal vaccination responses in adults with subnormal IgG subclass concentrations. *BMC Immunol*. 2019;20(1):29.
420. Roth A, Glaesener S, Schutz K, Meyer-Bahlburg A. Reduced Number of Transitional and Naive B Cells in Addition to Decreased BAFF Levels in Response to the T Cell Independent Immunogen Pneumovax(R)23. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152215.
421. Leggat DJ, Khaskhely NM, Iyer AS, Mosakowski J, Thompson RS, Weinandy JD, et al. Pneumococcal polysaccharide vaccination induces polysaccharide-specific B cells in adult peripheral blood expressing CD19(+)/CD20(+)/CD3(-)/CD70(-)/CD27(+)/IgM(+)/CD43(+)/CD5(+)/(-). *Vaccine*. 2013;31(41):4632-40.
422. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med*. 2011;208(1):67-80.
423. Rothstein TL. Natural Antibodies as Rheostats for Susceptibility to Chronic Diseases in the Aged. *Front Immunol*. 2016;7:127.
424. Rappuoli R, De Gregorio E, Costantino P. On the mechanisms of conjugate vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(1):14-6.
425. Pletz MW, Maus U, Krug N, Welte T, Lode H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation of the species. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(3):199-206.
426. Mykietiuk A, Carratala J, Dominguez A, Manzur A, Fernandez-Sabe N, Dorca J, et al. Effect of prior pneumococcal vaccination on clinical outcome of hospitalized adults with community-acquired pneumococcal pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25(7):457-62.
427. Christenson B, Lundbergh P, Hedlund J, Ortvist A. Effects of a large-scale intervention with influenza and 23-valent pneumococcal vaccines in adults aged 65 years or older: a prospective study. *Lancet*. 2001;357(9261):1008-11.
428. Hedlund J, Christenson B, Lundbergh P, Ortvist A. Effects of a large-scale intervention with influenza and 23-valent pneumococcal vaccines in elderly people: a 1-year follow-up. *Vaccine*. 2003;21(25-26):3906-11.
429. Bou Ghanem EN, Clark S, Roggensack SE, McIver SR, Alcaide P, Haydon PG, et al. Extracellular Adenosine Protects against Streptococcus pneumoniae Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. *PLoS Pathog*. 2015;11(8):e1005126.
430. Kaku H, Cheng KF, Al-Abed Y, Rothstein TL. A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J Immunol*. 2014;193(12):5904-13.

431. Pettengill MA, Levy O. Circulating Human Neonatal Naive B Cells are Deficient in CD73 Impairing Purine Salvage. *Front Immunol.* 2016;7:121.
432. Schena F, Volpi S, Faliti CE, Penco F, Santi S, Proietti M, et al. Dependence of immunoglobulin class switch recombination in B cells on vesicular release of ATP and CD73 ectonucleotidase activity. *Cell Rep.* 2013;3(6):1824-31.
433. Abbott RK, Silva M, Labuda J, Thayer M, Cain DW, Philbrook P, et al. The GS Protein-coupled A2a Adenosine Receptor Controls T Cell Help in the Germinal Center. *J Biol Chem.* 2017;292(4):1211-7.
434. Dong Y, Shi O, Zeng Q, Lu X, Wang W, Li Y, et al. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Exp Hematol Oncol.* 2020;9:14.
435. Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma.* 2006;47(8):1477-80.
436. Catovsky D, Wade R, Else M. The clinical significance of patients' sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2014;99(6):1088-94.
437. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94(11):1266-87.
438. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Niemann CU, Kater AP, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2021;32(1):23-33.
439. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;352(8):804-15.
440. Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood.* 2004;104(8):2499-504.
441. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 2004;113(7):1008-16.
442. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 2004;200(4):519-25.
443. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, Murray F, Laurell A, Willander K, et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2004;104(9):2879-85.
444. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005;105(12):4820-7.
445. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood.* 2011;117(23):6287-96.
446. Burger JA, Kipps TJ. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma.* 2002;43(3):461-6.
447. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood.* 2000;96(8):2655-63.
448. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood.* 1998;91(7):2387-96.
449. Darwiche W, Gubler B, Marolleau JP, Ghamlouch H. Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cell Normal Cellular Counterpart: Clues From a Functional Perspective. *Front Immunol.* 2018;9:683.
450. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111(12):5446-56.
451. Durig J, Naschar M, Schmucker U, Renzing-Kohler K, Holter T, Huttmann A, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia.* 2002;16(1):30-5.
452. Morabito F, Mangiola M, Oliva B, Stelitano C, Callea V, Deaglio S, et al. Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2001;25(11):927-32.
453. Jelinek DF, Tschumper RC, Geyer SM, Bone ND, Dewald GW, Hanson CA, et al. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;115(4):854-61.

454. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98(1):181-6.
455. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98(9):2633-9.
456. Vaisitti T, Aydin S, Rossi D, Cottino F, Bergui L, D'Arena G, et al. CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2010;24(5):958-69.
457. Funaro A, De Monte LB, Dianzani U, Forni M, Malavasi F. Human CD38 is associated to distinct molecules which mediate transmembrane signaling in different lineages. *Eur J Immunol*. 1993;23(10):2407-11.
458. Kitanaka A, Ito C, Coustan-Smith E, Campana D. CD38 ligation in human B cell progenitors triggers tyrosine phosphorylation of CD19 and association of CD19 with lyn and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*. 1997;159(1):184-92.
459. Lund FE, Yu N, Kim KM, Reth M, Howard MC. Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. *J Immunol*. 1996;157(4):1455-67.
460. Szankasi P, Bahler DW. Clinical laboratory analysis of immunoglobulin heavy chain variable region genes for chronic lymphocytic leukemia prognosis. *J Mol Diagn*. 2010;12(2):244-9.
461. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.
462. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194(11):1639-47.
463. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
464. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;250(4985):1233-8.
465. Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat*. 2014;35(6):672-88.
466. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Habe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4473-9.
467. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2009;23(1):117-24.
468. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2223-9.
469. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014;123(21):3247-54.
470. International CLLIPIwg. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):779-90.
471. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*. 2009;114(26):5307-14.
472. Amin NA, Seymour E, Saiya-Cork K, Parkin B, Shedden K, Malek SN. A Quantitative Analysis of Subclonal and Clonal Gene Mutations before and after Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2016;22(17):4525-35.
473. Knight SJ, Yau C, Clifford R, Timbs AT, Sadighi Akha E, Dreau HM, et al. Quantification of subclonal distributions of recurrent genomic aberrations in paired pre-treatment and relapse samples from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(7):1564-75.
474. Guieze R, Robbe P, Clifford R, de Guibert S, Pereira B, Timbs A, et al. Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood*. 2015;126(18):2110-7.
475. Campo E, Cymbalista F, Ghia P, Jager U, Pospisilova S, Rosenquist R, et al. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *Haematologica*. 2018;103(12):1956-68.
476. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
477. Lazarian G, Tausch E, Eclache V, Sebaa A, Bianchi V, Letestu R, et al. TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes. *Int J Cancer*. 2016;139(8):1759-63.

478. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol.* 2010;151(4):404-6.
479. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119(2):521-9.
480. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavolaro S, Gabrielli S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica.* 2012;97(3):437-41.
481. Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med.* 2013;210(11):2273-88.
482. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365(26):2497-506.
483. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood.* 2011;118(26):6904-8.
484. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2011;44(1):47-52.
485. Mansouri L, Cahill N, Gunnarsson R, Smedby KE, Tjonnfjord E, Hjalgrim H, et al. NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2013;27(2):512-4.
486. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, Gonzalez de Castro D, Gomez B, Forster J, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood.* 2013;121(3):468-75.
487. Zhang Z, Chen S, Chen S, Chen G, Zhang R, Li J, et al. SF3B1 mutation is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(41):69916-23.
488. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016;127(17):2122-30.
489. Quijada-Alamo M, Perez-Carretero C, Hernandez-Sanchez M, Rodriguez-Vicente AE, Herrero AB, Hernandez-Sanchez JM, et al. Dissecting the role of TP53 alterations in del(11q) chronic lymphocytic leukemia. *Clin Transl Med.* 2021;11(2):e304.
490. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia.* 2007;21(12):2442-51.
491. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;100(13):4609-14.
492. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005;105(5):2036-41.
493. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2004;363(9403):105-11.
494. Durig J, Nuckel H, Cremer M, Fuhrer A, Halfmeyer K, Fandrey J, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2003;17(12):2426-34.
495. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003;348(18):1764-75.
496. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2005;104(10):2124-32.
497. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nuckel H, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2014;32(9):897-904.
498. Dal Bo M, Bulian P, Bomben R, Zucchetto A, Rossi FM, Pozzo F, et al. CD49d prevails over the novel recurrent mutations as independent prognosticator of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2016;30(10):2011-8.
499. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, et al. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2008;93(10):1575-9.

500. Tissino E, Pozzo F, Benedetti D, Caldana C, Bittolo T, Rossi FM, et al. CD49d promotes disease progression in chronic lymphocytic leukemia: new insights from CD49d bimodal expression. *Blood*. 2020;135(15):1244-54.
501. Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P. Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol*. 1989;81(4):181-5.
502. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*. 1996;22(5-6):439-47.
503. Delgado J, Pratt G, Phillips N, Briones J, Fegan C, Nomdedeu J, et al. Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *Br J Haematol*. 2009;145(6):801-5.
504. Gentile M, Cutrona G, Neri A, Molica S, Ferrarini M, Morabito F. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*. 2009;94(6):887-8.
505. Magnac C, Porcher R, Davi F, Nataf J, Payelle-Brogard B, Tang RP, et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia*. 2003;17(1):133-7.
506. Matthews C, Catherwood MA, Morris TC, Kettle PJ, Drake MB, Gilmore WS, et al. Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur J Haematol*. 2006;77(4):309-17.
507. Konoplev SN, Fritsche HA, O'Brien S, Wierda WG, Keating MJ, Gornet TG, et al. High serum thymidine kinase 1 level predicts poorer survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(3):472-7.
508. Stelmach P, Blonski JZ, Wawrzyniak E, Schweiger PE, Wilandt A, Majak PE, et al. Prognostic value of thymidine kinase activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016;70(0):1321-30.
509. Saka B, Aktan M, Sami U, Oner D, Sanem O, Dincol G. Prognostic importance of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lab Haematol*. 2006;28(1):30-5.
510. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996;88(11):4259-64.
511. Rossi D, Spina V, Gaidano G. Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood*. 2018;131(25):2761-72.
512. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206.
513. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 1998;338(21):1506-14.
514. Hoehstetter MA, Busch R, Eichhorst B, Buhler A, Winkler D, Eckart MJ, et al. Early, risk-adapted treatment with fludarabine in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: results of the CLL1 trial of the German CLL study group. *Leukemia*. 2017;31(12):2833-7.
515. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(10):861-8.
516. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-234. *Blood*. 2016;128(17):2109.
517. Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. In: Gale RP, Rai KR, eds. *Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Directions*. UCLA symposia on Molecular and Cellular Biology. 1987;59:253-64.
518. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(24):1750-7.
519. Johnson S, Smith AG, Loffler H, Osby E, Juliusson G, Emmerich B, et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet*. 1996;347(9013):1432-8.
520. Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*. 2001;98(8):2319-25.
521. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, Liberati A, Loscertales J, Herbrecht R, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4378-84.
522. Niederle N, Megdenberg D, Balleisen L, Heit W, Knauf W, Weiss J, et al. Bendamustine compared to fludarabine as second-line treatment in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol*. 2013;92(5):653-60.

523. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1.
524. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1164-74.
525. Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood.* 2002;99(4):1314-9.
526. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW, Pearson M, Young D, Reed JC, et al. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *J Clin Oncol.* 2003;21(8):1466-71.
527. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood.* 2001;98(12):3383-9.
528. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* 2004;64(13):4664-9.
529. Lefebvre ML, Krause SW, Salcedo M, Nardin A. Ex vivo-activated human macrophages kill chronic lymphocytic leukemia cells in the presence of rituximab: mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity and impact of human serum. *J Immunother.* 2006;29(4):388-97.
530. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood.* 2002;99(3):754-8.
531. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2003;21(21):3940-7.
532. Middleton O, Cosimo E, Dobbin E, McCaig AM, Clarke C, Brant AM, et al. Complement deficiencies limit CD20 monoclonal antibody treatment efficacy in CLL. *Leukemia.* 2015;29(1):107-14.
533. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, DiLillo DJ, Lindorfer MA, Hess CE, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol.* 2004;172(5):3280-8.
534. Klepfish A, Gilles L, Ioannis K, Rachmilewitz EA, Schattner A. Enhancing the action of rituximab in chronic lymphocytic leukemia by adding fresh frozen plasma: complement/rituximab interactions & clinical results in refractory CLL. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:865-73.
535. Xu W, Miao KR, Zhu DX, Fang C, Zhu HY, Dong HJ, et al. Enhancing the action of rituximab by adding fresh frozen plasma for the treatment of fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer.* 2011;128(9):2192-201.
536. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol.* 2006;177(1):362-71.
537. Patz M, Isaeva P, Forcob N, Muller B, Frenzel LP, Wendtner CM, et al. Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2011;152(3):295-306.
538. Olejniczak SH, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Clements JL, Czuczman MS. Acquired resistance to rituximab is associated with chemotherapy resistance resulting from decreased Bax and Bak expression. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1550-60.
539. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* 2007;67(3):1270-81.
540. Small GW, McLeod HL, Richards KL. Analysis of innate and acquired resistance to anti-CD20 antibodies in malignant and nonmalignant B cells. *PeerJ.* 2013;1:e31.
541. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H, et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1561-70.
542. Beers SA, French RR, Chan HT, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood.* 2010;115(25):5191-201.
543. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol.* 2006;176(4):2600-9.

544. Rodig SJ, Abramson JS, Pinkus GS, Treon SP, Dorfman DM, Dong HY, et al. Heterogeneous CD52 expression among hematologic neoplasms: implications for the use of alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Clin Cancer Res.* 2006;12(23):7174-9.
545. Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, Pangalis GA, Bastion Y, Catovsky D, et al. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. J Clin Oncol.* 1997;15(4):1567-74.
546. Rai KR, Freter CE, Mercier RJ, Cooper MR, Mitchell BS, Stadtmauer EA, et al. Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. *J Clin Oncol.* 2002;20(18):3891-7.
547. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, Smith L, Harbison J, Webb J, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood.* 2004;103(9):3278-81.
548. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J, et al. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2007;25(35):5616-23.
549. Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;120(24):4684-91.
550. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118(13):3603-12.
551. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;123(22):3390-7.
552. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2014;370(11):997-1007.
553. Flinn IW, Hillmen P, Montillo M, Nagy Z, Illes A, Etienne G, et al. The phase 3 DUO trial: duvelisib vs ofatumumab in relapsed and refractory CLL/SLL. *Blood.* 2018;132(23):2446-55.
554. Davids MS, Kuss BJ, Hillmen P, Montillo M, Moreno C, Essell J, et al. Efficacy and Safety of Duvelisib Following Disease Progression on Ofatumumab in Patients with Relapsed/Refractory CLL or SLL in the DUO Crossover Extension Study. *Clin Cancer Res.* 2020;26(9):2096-103.
555. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371(3):213-23.
556. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2015;373(25):2425-37.
557. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med.* 2014;370(24):2286-94.
558. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, Heerema NA, Zhao W, Abruzzo L, et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol.* 2015;1(1):80-7.
559. Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, Lehman A, Blachly JS, Lozanski A, et al. BTK(C481S)-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2017;35(13):1437-43.
560. Chen TL, Harrington B, Truxall J, Wasmuth R, Prouty A, Sloan S, et al. Preclinical evaluation of the Hsp90 inhibitor SNX-5422 in ibrutinib resistant CLL. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):36.
561. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, et al. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(4):323-32.
562. Sharman JP, Egyed M, Jurczak W, Skarbnik A, Pagel JM, Flinn IW, et al. Acalabrutinib with or without obinutuzumab versus chlorambucil and obinutuzumab for treatment-naive chronic lymphocytic leukaemia (ELEVATE TN): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2020;395(10232):1278-91.
563. Ghia P, Pluta A, Wach M, Lysak D, Kozak T, Simkovic M, et al. ASCEND: Phase III, Randomized Trial of Acalabrutinib Versus Idelalisib Plus Rituximab or Bendamustine Plus Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2020;38(25):2849-61.
564. Kabadi SM, Near A, Wada K, Burudpakdee C. Real-World Treatment Patterns, Adverse Events, Resource Use, and Costs Among Commercially Insured, Younger Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia in the USA: A Retrospective Cohort Study. *Adv Ther.* 2020;37(7):3129-48.
565. Williams AM, Baran AM, Schaffer M, Bushart J, Rich L, Moore J, et al. Significant weight gain in CLL patients treated with ibrutinib: A potentially deleterious consequence of therapy. *Am J Hematol.* 2020;95(1):E16-E8.
566. Strati P, Parikh SA, Chaffee KG, Kay NE, Call TG, Achenbach SJ, et al. Relationship between co-morbidities at diagnosis, survival and ultimate cause of death in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a prospective cohort study. *Br J Haematol.* 2017;178(3):394-402.

567. Frenzel A, Grespi F, Chmielewskij W, Villunger A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis*. 2009;14(4):584-96.
568. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(4):311-22.
569. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):768-78.
570. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink AM, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med*. 2019;380(23):2225-36.
571. Guieze R, Liu VM, Rosebrock D, Jourdain AA, Hernandez-Sanchez M, Martinez Zurita A, et al. Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies. *Cancer Cell*. 2019;36(4):369-84 e13.
572. Herling CD, Abedpour N, Weiss J, Schmitt A, Jachimowicz RD, Merkel O, et al. Clonal dynamics towards the development of venetoclax resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun*. 2018;9(1):727.
573. Tausch E, Close W, Dolnik A, Bloehdorn J, Chyla B, Bullinger L, et al. Venetoclax resistance and acquired BCL2 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2019;104(9):e434-e7.
574. Blombery P, Anderson MA, Gong JN, Thijssen R, Birkinshaw RW, Thompson ER, et al. Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discov*. 2019;9(3):342-53.
575. Blombery P, Thompson ER, Nguyen T, Birkinshaw RW, Gong JN, Chen X, et al. Multiple BCL2 mutations cooccurring with Gly101Val emerge in chronic lymphocytic leukemia progression on venetoclax. *Blood*. 2020;135(10):773-7.
576. Gribben JG. How and when I do allogeneic transplant in CLL. *Blood*. 2018;132(1):31-9.
577. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):928-42.
578. Moreno C, Greil R, Demirkan F, Tedeschi A, Anz B, Larratt L, et al. Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(1):43-56.
579. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, Zhao W, Booth AM, Ding W, et al. Ibrutinib Regimens versus Chemoimmunotherapy in Older Patients with Untreated CLL. *N Engl J Med*. 2018;379(26):2517-28.
580. Burger JA, Sivina M, Jain N, Kim E, Kadia T, Estrov Z, et al. Randomized trial of ibrutinib vs ibrutinib plus rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2019;133(10):1011-9.
581. Morabito F, Tripepi G, Del Poeta G, Mauro FR, Reda G, Sportoletti P, et al. Comparison of ibrutinib and idelalisib plus rituximab in real-life relapsed/resistant chronic lymphocytic leukemia cases. *Eur J Haematol*. 2021;106(4):493-9.
582. Giannopoulos K, Schmitt M, Kowal M, Wlasiuk P, Bojarska-Junak A, Chen J, et al. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep*. 2008;20(3):677-82.
583. Jak M, Mous R, Remmerswaal EB, Spijker R, Jaspers A, Yague A, et al. Enhanced formation and survival of CD4+ CD25hi Foxp3+ T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(5):788-801.
584. D'Arena G, Laurenti L, Minervini MM, Deaglio S, Bonello L, De Martino L, et al. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res*. 2011;35(3):363-8.
585. Biancotto A, Dagur PK, Fuchs JC, Wiestner A, Bagwell CB, McCoy JP, Jr. Phenotypic complexity of T regulatory subsets in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mod Pathol*. 2012;25(2):246-59.
586. Lad DP, Varma S, Varma N, Sachdeva MU, Bose P, Malhotra P. Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: their role in disease progression and autoimmune cytopenias. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(5):1012-9.
587. Piper KP, Karanth M, McLarnon A, Kalk E, Khan N, Murray J, et al. Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells. *Clin Exp Immunol*. 2011;166(2):154-63.
588. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood*. 2012;120(7):1412-21.

589. Catakovic K, Gassner FJ, Ratswohl C, Zaborsky N, Rebhandl S, Schubert M, et al. TIGIT expressing CD4+T cells represent a tumor-supportive T cell subset in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*. 2017;7(1):e1371399.
590. Motta M, Rassenti L, Shelvin BJ, Lerner S, Kipps TJ, Keating MJ, et al. Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2005;19(10):1788-93.
591. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgun G, Le Dieu R, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2427-37.
592. Brusa D, Serra S, Coscia M, Rossi D, D'Arena G, Laurenti L, et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(6):953-63.
593. Grzywnowicz M, Karczmarczyk A, Skorka K, Zajac M, Zaleska J, Chocholska S, et al. Expression of Programmed Death 1 Ligand in Different Compartments of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Acta Haematol*. 2015;134(4):255-62.
594. Lewinsky H, Barak AF, Huber V, Kramer MP, Radomir L, Sever L, et al. CD84 regulates PD-1/PD-L1 expression and function in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2018;128(12):5465-78.
595. Qorraj M, Bruns H, Bottcher M, Weigand L, Saul D, Mackensen A, et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to immune metabolic dysfunctions of monocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(2):470-8.
596. McClanahan F, Hanna B, Miller S, Clear AJ, Lichter P, Gribben JG, et al. PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(2):203-11.
597. Ioannou N, Hagner PR, Stokes M, Gandhi AK, Apollonio B, Fanous M, et al. Triggering interferon signaling in T cells with avadomide sensitizes CLL to anti-PD-L1/PD-1 immunotherapy. *Blood*. 2021;137(2):216-31.
598. Ding W, LaPlant BR, Call TG, Parikh SA, Leis JF, He R, et al. Pembrolizumab in patients with CLL and Richter transformation or with relapsed CLL. *Blood*. 2017;129(26):3419-27.
599. Younes A, Brody J, Carpio C, Lopez-Guillermo A, Ben-Yehuda D, Ferhanoglu B, et al. Safety and activity of ibrutinib in combination with nivolumab in patients with relapsed non-Hodgkin lymphoma or chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1/2a study. *Lancet Haematol*. 2019;6(2):e67-e78.
600. Al-Juhaiishi T, Ahmed S. Selecting the Optimal CAR-T for the Treatment of B-Cell Malignancies. *Curr Hematol Malig Rep*. 2021;16(1):32-9.
601. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(8):725-33.
602. Turtle CJ, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Cherian S, Chen X, et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *J Clin Oncol*. 2017;35(26):3010-20.
603. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, et al. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*. 2011;118(23):6141-52.
604. Kicova M, Michalova Z, Coma M, Gabzdilova J, Dedinska K, Guman T, et al. The expression of CD73 on pathological B-cells is associated with shorter overall survival of patients with CLL. *Neoplasma*. 2020;67(4):933-8.
605. Pulte D, Furman RR, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Ballard HS, Olson KE, et al. CD39 expression on T lymphocytes correlates with severity of disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(4):367-72.
606. Abousamra NK, Salah El-Din M, Hamza Elzahaf E, Esmael ME. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (E-NTPDase1/CD39) as a new prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(1):113-9.
607. Bennett F, Rawstron A, Plummer M, de Tute R, Moreton P, Jack A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle. *Br J Haematol*. 2007;139(4):600-4.
608. Vaisitti T, Arruga F, Deaglio S. Targeting the Adenosinergic Axis in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Way to Disrupt the Tumor Niche? *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
609. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*. 2002;99(11):4087-93.
610. Cro L, Morabito F, Zucal N, Fabris S, Lionetti M, Cutrona G, et al. CD26 expression in mature B-cell neoplasia: its possible role as a new prognostic marker in B-CLL. *Hematol Oncol*. 2009;27(3):140-7.

611. Ibrahem L, Elderiny WE, Elhelw L, Ismail M. CD49d and CD26 are independent prognostic markers for disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2015;55(2):154-60.
612. Matuszak M, Lewandowski K, Czyz A, Kiernicka-Parulska J, Przybylowicz-Chalecka A, Jarmuz-Szymczak M, et al. The prognostic significance of surface dipeptidylpeptidase IV (CD26) expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2016;47:166-71.
613. Molica S, Digiesi G, Mirabelli R, Cutrona G, Antenucci A, Molica M, et al. Serum level of CD26 predicts time to first treatment in early B-chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol.* 2009;83(3):208-14.
614. Ghaderi B, Amini S, Maroofi F, Jalali C, Javanmardi M, Roshani D, et al. Adenosine Deaminase Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia and Healthy Subjects. *Iran J Cancer Prev.* 2016;9(3):e5069.
615. Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, et al. Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2003;101(6):2328-34.
616. Molina-Arcas M, Marce S, Villamor N, Huber-Ruano I, Casado FJ, Bellosillo B, et al. Equilibrative nucleoside transporter-2 (hENT2) protein expression correlates with ex vivo sensitivity to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia.* 2005;19(1):64-8.
617. Arruga F, Serra S, Vitale N, Guerra G, Papait A, Baffour Gyau B, et al. Targeting of the A2A adenosine receptor counteracts immunosuppression in vivo in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2021;106(5):1343-53.
618. Shachar I, Cohen S, Marom A, Becker-Herman S. Regulation of CLL survival by hypoxia-inducible factor and its target genes. *FEBS Lett.* 2012;586(18):2906-10.
619. Serra S, Vaisitti T, Audrito V, Bologna C, Buonincontri R, Chen SS, et al. Adenosine signaling mediates hypoxic responses in the chronic lymphocytic leukemia microenvironment. *Blood Adv.* 2016;1(1):47-61.
620. Yan XJ, Albesiano E, Zanesi N, Yancopoulos S, Sawyer A, Romano E, et al. B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(31):11713-8.
621. Hamblin TJ. The TCL1 mouse as a model for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2010;34(2):135-6.
622. Johnson AJ, Lucas DM, Muthusamy N, Smith LL, Edwards RB, De Lay MD, et al. Characterization of the TCL-1 transgenic mouse as a preclinical drug development tool for human chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006;108(4):1334-8.
623. Simonetti G, Bertilaccio MT, Ghia P, Klein U. Mouse models in the study of chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and therapy. *Blood.* 2014;124(7):1010-9.
624. Warburg O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klin Wochenschr.* 1925;4(12):534-36.
625. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14.
626. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
627. DeBerardinis RJ, Chandel NS. We need to talk about the Warburg effect. *Nat Metab.* 2020;2(2):127-9.
628. Chen PH, Cai L, Huffman K, Yang C, Kim J, Faubert B, et al. Metabolic Diversity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Mol Cell.* 2019;76(5):838-51 e5.
629. Otto AM. Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer Metab.* 2016;4:5.
630. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2018;24(11):2482-90.
631. Hosios AM, Hecht VC, Danai LV, Johnson MO, Rathmell JC, Steinhauser ML, et al. Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell.* 2016;36(5):540-9.
632. Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, Miller L, Wang Z, Wheaton W, et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell.* 2013;24(2):213-28.
633. Potter VR. The biochemical approach to the cancer problem. *Fed Proc.* 1958;17(2):691-7.
634. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-33.
635. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:441-64.
636. Luengo A, Li Z, Gui DY, Sullivan LB, Zagorulya M, Do BT, et al. Increased demand for NAD(+) relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Mol Cell.* 2021;81(4):691-707 e6.
637. Vander AJ, Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *PHYSIOLOGIE HUMAINE VANDER (Français).* 6 ed: Cheneliere; 2013.
638. Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng.* 2017;19:163-94.

639. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vazquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D608-D17.
640. Bode BP, Souba WW. Glutamine transport and human hepatocellular transformation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1999;23(5 Suppl):S33-7.
641. Fan J, Kamphorst JJ, Mathew R, Chung MK, White E, Shlomi T, et al. Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol Syst Biol.* 2013;9:712.
642. Yang L, Moss T, Mangala LS, Marini J, Zhao H, Wahlig S, et al. Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. *Mol Syst Biol.* 2014;10:728.
643. van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, Marshall AD, Thoeng A, Gao D, et al. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene.* 2016;35(24):3201-8.
644. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19345-50.
645. Cassago A, Ferreira AP, Ferreira IM, Fornezari C, Gomes ER, Greene KS, et al. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(4):1092-7.
646. Yoo HC, Park SJ, Nam M, Kang J, Kim K, Yeo JH, et al. A Variant of SLC1A5 Is a Mitochondrial Glutamine Transporter for Metabolic Reprogramming in Cancer Cells. *Cell Metab.* 2020;31(2):267-83 e12.
647. McCommis KS, Finck BN. Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochem J.* 2015;466(3):443-54.
648. Tan AS, Baty JW, Dong LF, Bezawork-Geleta A, Endaya B, Goodwin J, et al. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab.* 2015;21(1):81-94.
649. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(19):8788-93.
650. Roth KG, Mambetsariev I, Kulkarni P, Salgia R. The Mitochondrion as an Emerging Therapeutic Target in Cancer. *Trends Mol Med.* 2020;26(1):119-34.
651. Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* 2011;25(5):460-70.
652. Zdravlevic M, Brand A, Di Ianni L, Dettmer K, Reinders J, Singer K, et al. Double genetic disruption of lactate dehydrogenases A and B is required to ablate the "Warburg effect" restricting tumor growth to oxidative metabolism. *J Biol Chem.* 2018;293(41):15947-61.
653. Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Martincorena I, Nik-Zainal S, Ramakrishna M, et al. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Elife.* 2014;3.
654. Joshi S, Tolkunov D, Aviv H, Hakimi AA, Yao M, Hsieh JJ, et al. The Genomic Landscape of Renal Oncocytoma Identifies a Metabolic Barrier to Tumorigenesis. *Cell Rep.* 2015;13(9):1895-908.
655. Fischer GM, Guerrieri RA, Hu Q, Joon AY, Kumar S, Haydu LE, et al. Clinical, molecular, metabolic, and immune features associated with oxidative phosphorylation in melanoma brain metastases. *Neurooncol Adv.* 2021;3(1):vdaal177.
656. Mracek T, Drahota Z, Houstek J. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1827(3):401-10.
657. Pelley J. Citric Acid Cycle, Electron Transport Chain, and Oxidative Phosphorylation. *Elsevier's Integrated Biochemistry (Second Edition).* 2 ed: Elsevier; 2012. p. 57-65.
658. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, Zhu XG, Fidelin J, Sviderskiy VO, et al. Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):775-81.
659. Greenhouse WV, Lehninger AL. Occurrence of the malate-aspartate shuttle in various tumor types. *Cancer Res.* 1976;36(4):1392-6.
660. Altinok O, Poggio JL, Stein DE, Bowne WB, Shieh AC, Snyder NW, et al. Malate-aspartate shuttle promotes l-lactate oxidation in mitochondria. *J Cell Physiol.* 2020;235(3):2569-81.
661. Gaude E, Schmidt C, Gammage PA, Dugourd A, Blacker T, Chew SP, et al. NADH Shuttling Couples Cytosolic Reductive Carboxylation of Glutamine with Glycolysis in Cells with Mitochondrial Dysfunction. *Mol Cell.* 2018;69(4):581-93 e7.
662. Kang JH, Lee SH, Lee JS, Nam B, Seong TW, Son J, et al. Aldehyde dehydrogenase inhibition combined with phenformin treatment reversed NSCLC through ATP depletion. *Oncotarget.* 2016;7(31):49397-410.

663. Lee JS, Lee H, Lee S, Kang JH, Lee SH, Kim SG, et al. Loss of SLC25A11 causes suppression of NSCLC and melanoma tumor formation. *EBioMedicine*. 2019;40:184-97.
664. Lee JS, Choi J, Lee SH, Kang JH, Ha JS, Kim HY, et al. Oxoglutarate Carrier Inhibition Reduced Melanoma Growth and Invasion by Reducing ATP Production. *Pharmaceutics*. 2020;12(11).
665. Sun J, Nagel R, Zaal EA, Ugalde AP, Han R, Proost N, et al. SLC1A3 contributes to L-asparaginase resistance in solid tumors. *EMBO J*. 2019;38(21):e102147.
666. Cheng CT, Qi Y, Wang YC, Chi KK, Chung Y, Ouyang C, et al. Arginine starvation kills tumor cells through aspartate exhaustion and mitochondrial dysfunction. *Commun Biol*. 2018;1:178.
667. Pan G, Wang R, Jia S, Li Y, Jiao Y, Liu N. SLC25A11 serves as a novel prognostic biomarker in liver cancer. *Sci Rep*. 2020;10(1):9871.
668. Buffet A, Morin A, Castro-Vega LJ, Habarou F, Lussey-Lepoutre C, Letouze E, et al. Germline Mutations in the Mitochondrial 2-Oxoglutarate/Malate Carrier SLC25A11 Gene Confer a Predisposition to Metastatic Paragangliomas. *Cancer Res*. 2018;78(8):1914-22.
669. Alkan HF, Vesely PW, Hackl H, Fosselteder J, Schmidt DR, Vander Heiden MG, et al. Deficiency of malate-aspartate shuttle component SLC25A12 induces pulmonary metastasis. *Cancer Metab*. 2020;8(1):26.
670. Vasan K, Werner M, Chandel NS. Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metab*. 2020;32(3):341-52.
671. Parey K, Haapanen O, Sharma V, Kofeler H, Zullig T, Prinz S, et al. High-resolution cryo-EM structures of respiratory complex I: Mechanism, assembly, and disease. *Sci Adv*. 2019;5(12):eaax9484.
672. Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, et al. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*. 2005;121(7):1043-57.
673. Zong S, Wu M, Gu J, Liu T, Guo R, Yang M. Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. *Cell Res*. 2018;28(10):1026-34.
674. Hahn A, Parey K, Bublitz M, Mills DJ, Zickermann V, Vonck J, et al. Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Mol Cell*. 2016;63(3):445-56.
675. Zhou Y, Duncan TM, Cross RL. Subunit rotation in Escherichia coli FoF1-ATP synthase during oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):10583-7.
676. Martinez-Reyes I, Cardona LR, Kong H, Vasan K, McElroy GS, Werner M, et al. Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumour growth. *Nature*. 2020;585(7824):288-92.
677. Telang S, Nelson KK, Siow DL, Yalcin A, Thornburg JM, Imbert-Fernandez Y, et al. Cytochrome c oxidase is activated by the oncoprotein Ras and is required for A549 lung adenocarcinoma growth. *Mol Cancer*. 2012;11:60.
678. Fu X, Chin RM, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Xing Y, et al. 2-Hydroxyglutarate Inhibits ATP Synthase and mTOR Signaling. *Cell Metab*. 2015;22(3):508-15.
679. Zhang X, Gao F, Yu LL, Peng Y, Liu HH, Liu JY, et al. Dual functions of a monoclonal antibody against cell surface F1F0 ATP synthase on both HUVEC and tumor cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(8):942-50.
680. Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell*. 2015;162(3):540-51.
681. Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM, Bush LN, Freinkman E, Vander Heiden MG. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell*. 2015;162(3):552-63.
682. Gui DY, Sullivan LB, Luengo A, Hosios AM, Bush LN, Gitego N, et al. Environment Dictates Dependence on Mitochondrial Complex I for NAD⁺ and Aspartate Production and Determines Cancer Cell Sensitivity to Metformin. *Cell Metab*. 2016;24(5):716-27.
683. Seo BB, Kitajima-Ihara T, Chan EK, Scheffler IE, Matsuno-Yagi A, Yagi T. Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9167-71.
684. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*. 2014;3:e02242.
685. Alkan HF, Walter KE, Luengo A, Madreiter-Sokolowski CT, Stryeck S, Lau AN, et al. Cytosolic Aspartate Availability Determines Cell Survival When Glutamine Is Limiting. *Cell Metab*. 2018;28(5):706-20 e6.
686. Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(29):10574-9.
687. Gurumurthy S, Xie SZ, Alagesan B, Kim J, Yusuf RZ, Saez B, et al. The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature*. 2010;468(7324):659-63.

688. Viale A, Pettazzoni P, Lyssiotis CA, Ying H, Sanchez N, Marchesini M, et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*. 2014;514(7524):628-32.
689. Valle S, Alcalá S, Martín-Hijano L, Cabezas-Sainz P, Navarro D, Muñoz ER, et al. Exploiting oxidative phosphorylation to promote the stem and immunoevasive properties of pancreatic cancer stem cells. *Nat Commun*. 2020;11(1):5265.
690. Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, et al. MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab*. 2015;22(4):590-605.
691. Liu G, Luo Q, Li H, Liu Q, Ju Y, Song G. Increased Oxidative Phosphorylation Is Required for Stemness Maintenance in Liver Cancer Stem Cells from Hepatocellular Carcinoma Cell Line HCCLM3 Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15).
692. Janiszewska M, Suva ML, Riggi N, Houtkooper RH, Auwerx J, Clement-Schatlo V, et al. Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells. *Genes Dev*. 2012;26(17):1926-44.
693. Ye XQ, Li Q, Wang GH, Sun FF, Huang GJ, Bian XW, et al. Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int J Cancer*. 2011;129(4):820-31.
694. Lee KM, Giltnane JM, Balko JM, Schwarz LJ, Guerrero-Zotano AL, Hutchinson KE, et al. MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab*. 2017;26(4):633-47 e7.
695. Masoud R, Reyes-Castellanos G, Lac S, Garcia J, Dou S, Shintu L, et al. Targeting Mitochondrial Complex I Overcomes Chemoresistance in High OXPHOS Pancreatic Cancer. *Cell Rep Med*. 2020;1(8):100143.
696. Dar S, Chhina J, Mert I, Chitale D, Buekers T, Kaur H, et al. Bioenergetic Adaptations in Chemoresistant Ovarian Cancer Cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):8760.
697. Vellinga TT, Borovski T, de Boer VC, Fatrai S, van Schelven S, Trumpi K, et al. SIRT1/PGC1 α -Dependent Increase in Oxidative Phosphorylation Supports Chemotherapy Resistance of Colon Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(12):2870-9.
698. Schockel L, Glasauer A, Basit F, Bitschar K, Truong H, Erdmann G, et al. Targeting mitochondrial complex I using BAY 87-2243 reduces melanoma tumor growth. *Cancer Metab*. 2015;3:11.
699. Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell*. 2013;23(3):302-15.
700. Vitiello GA, Medina BD, Zeng S, Bowler TG, Zhang JQ, Loo JK, et al. Mitochondrial Inhibition Augments the Efficacy of Imatinib by Resetting the Metabolic Phenotype of Gastrointestinal Stromal Tumor. *Clin Cancer Res*. 2018;24(4):972-84.
701. Zhang L, Yao Y, Zhang S, Liu Y, Guo H, Ahmed M, et al. Metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation identifies a therapeutic target for mantle cell lymphoma. *Sci Transl Med*. 2019;11(491).
702. Zacksenhaus E, Shrestha M, Liu JC, Vorobieva I, Chung PED, Ju Y, et al. Mitochondrial OXPHOS Induced by RB1 Deficiency in Breast Cancer: Implications for Anabolic Metabolism, Stemness, and Metastasis. *Trends Cancer*. 2017;3(11):768-79.
703. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(10):992-1003, 1-15.
704. Hu Y, Xu W, Zeng H, He Z, Lu X, Zuo D, et al. OXPHOS-dependent metabolic reprogramming prompts metastatic potential of breast cancer cells under osteogenic differentiation. *Br J Cancer*. 2020;123(11):1644-55.
705. Nie K, Li J, He X, Wang Y, Zhao Q, Du M, et al. COX6B2 drives metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation to promote metastasis in pancreatic ductal cancer cells. *Oncogenesis*. 2020;9(5):51.
706. Sun X, Zhan L, Chen Y, Wang G, He L, Wang Q, et al. Increased mtDNA copy number promotes cancer progression by enhancing mitochondrial oxidative phosphorylation in microsatellite-stable colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2018;3:8.
707. Navas LE, Carnero A. NAD(+) metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):2.
708. James EL, Lane JA, Michalek RD, Karoly ED, Parkinson EK. Replicatively senescent human fibroblasts reveal a distinct intracellular metabolic profile with alterations in NAD⁺ and nicotinamide metabolism. *Sci Rep*. 2016;6:38489.
709. Gasparini M, Sorci L, Raffaelli N. Enzymology of extracellular NAD metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(7):3317-31.

710. Camacho-Pereira J, Tarrago MG, Chini CCS, Nin V, Escande C, Warner GM, et al. CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab.* 2016;23(6):1127-39.
711. Tarrago MG, Chini CCS, Kanamori KS, Warner GM, Caride A, de Oliveira GC, et al. A Potent and Specific CD38 Inhibitor Ameliorates Age-Related Metabolic Dysfunction by Reversing Tissue NAD(+) Decline. *Cell Metab.* 2018;27(5):1081-95 e10.
712. Chini C, Hogan KA, Warner GM, Tarrago MG, Peclat TR, Tchkonina T, et al. The NADase CD38 is induced by factors secreted from senescent cells providing a potential link between senescence and age-related cellular NAD(+) decline. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;513(2):486-93.
713. Bender DA. Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Mol Aspects Med.* 1983;6(2):101-97.
714. Preiss J, Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *J Biol Chem.* 1958;233(2):493-500.
715. Katsyuba E, Romani M, Hofer D, Auwerx J. NAD(+) homeostasis in health and disease. *Nat Metab.* 2020;2(1):9-31.
716. Bieganowski P, Brenner C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell.* 2004;117(4):495-502.
717. Sociali G, Raffaghello L, Magnone M, Zamporlini F, Emionite L, Sturla L, et al. Antitumor effect of combined NAMPT and CD73 inhibition in an ovarian cancer model. *Oncotarget.* 2016;7(3):2968-84.
718. Ratajczak J, Joffraud M, Trammell SA, Ras R, Canela N, Boutant M, et al. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nat Commun.* 2016;7:13103.
719. Nikiforov A, Dolle C, Niere M, Ziegler M. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J Biol Chem.* 2011;286(24):21767-78.
720. Garavaglia S, Bruzzone S, Cassani C, Canella L, Allegrone G, Sturla L, et al. The high-resolution crystal structure of periplasmic *Haemophilus influenzae* NAD nucleotidase reveals a novel enzymatic function of human CD73 related to NAD metabolism. *Biochem J.* 2012;441(1):131-41.
721. Kulikova V, Shabalin K, Nerinovski K, Dolle C, Niere M, Yakimov A, et al. Generation, Release, and Uptake of the NAD Precursor Nicotinic Acid Riboside by Human Cells. *J Biol Chem.* 2015;290(45):27124-37.
722. Wilk A, Hayat F, Cunningham R, Li J, Garavaglia S, Zamani L, et al. Extracellular NAD(+) enhances PARP-dependent DNA repair capacity independently of CD73 activity. *Sci Rep.* 2020;10(1):651.
723. Grozio A, Sociali G, Sturla L, Caffa I, Soncini D, Salis A, et al. CD73 protein as a source of extracellular precursors for sustained NAD⁺ biosynthesis in FK866-treated tumor cells. *J Biol Chem.* 2013;288(36):25938-49.
724. Mateuszuk L, Campagna R, Kutryb-Zajac B, Kus K, Slominska EM, Smolenski RT, et al. Reversal of endothelial dysfunction by nicotinamide mononucleotide via extracellular conversion to nicotinamide riboside. *Biochem Pharmacol.* 2020;178:114019.
725. Zhu Y, Liu J, Park J, Rai P, Zhai RG. Subcellular compartmentalization of NAD(+) and its role in cancer: A sereNADe of metabolic melodies. *Pharmacol Ther.* 2019;200:27-41.
726. Davila A, Liu L, Chellappa K, Redpath P, Nakamaru-Ogiso E, Paoletta LM, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria. *Elife.* 2018;7.
727. Kory N, Uit de Bos J, van der Rijt S, Jankovic N, Gura M, Arp N, et al. MCART1/SLC25A51 is required for mitochondrial NAD transport. *Sci Adv.* 2020;6(43).
728. Girardi E, Agrimi G, Goldmann U, Fiume G, Lindinger S, Sedlyarov V, et al. Epistasis-driven identification of SLC25A51 as a regulator of human mitochondrial NAD import. *Nat Commun.* 2020;11(1):6145.
729. Luongo TS, Eller JM, Lu MJ, Niere M, Raith F, Perry C, et al. SLC25A51 is a mammalian mitochondrial NAD(+) transporter. *Nature.* 2020;588(7836):174-9.
730. Canto C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y, et al. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.* 2012;15(6):838-47.
731. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* 2002;297(5579):259-63.
732. Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(10):608-24.
733. Berger F, Lau C, Dahlmann M, Ziegler M. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem.* 2005;280(43):36334-41.

734. Ying W, Garnier P, Swanson RA. NAD⁺ repletion prevents PARP-1-induced glycolytic blockade and cell death in cultured mouse astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308(4):809-13.
735. Park EY, Woo Y, Kim SJ, Kim DH, Lee EK, De U, et al. Anticancer Effects of a New SIRT Inhibitor, MHY2256, against Human Breast Cancer MCF-7 Cells via Regulation of MDM2-p53 Binding. *Int J Biol Sci*. 2016;12(12):1555-67.
736. Liu PY, Xu N, Malyukova A, Scarlett CJ, Sun YT, Zhang XD, et al. The histone deacetylase SIRT2 stabilizes Myc oncoproteins. *Cell Death Differ*. 2013;20(3):503-14.
737. Mishra RK, Wei C, Hresko RC, Bajpai R, Heitmeier M, Matulis SM, et al. In Silico Modeling-based Identification of Glucose Transporter 4 (GLUT4)-selective Inhibitors for Cancer Therapy. *J Biol Chem*. 2015;290(23):14441-53.
738. Wood TE, Dalili S, Simpson CD, Hurren R, Mao X, Saiz FS, et al. A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(11):3546-55.
739. Chan DA, Sutphin PD, Nguyen P, Turcotte S, Lai EW, Banh A, et al. Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci Transl Med*. 2011;3(94):94ra70.
740. Wu KH, Ho CT, Chen ZF, Chen LC, Whang-Peng J, Lin TN, et al. The apple polyphenol phloretin inhibits breast cancer cell migration and proliferation via inhibition of signals by type 2 glucose transporter. *J Food Drug Anal*. 2018;26(1):221-31.
741. Martin HJ, Kornmann F, Fuhrmann GF. The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes. *Chem Biol Interact*. 2003;146(3):225-35.
742. Lin ST, Tu SH, Yang PS, Hsu SP, Lee WH, Ho CT, et al. Apple Polyphenol Phloretin Inhibits Colorectal Cancer Cell Growth via Inhibition of the Type 2 Glucose Transporter and Activation of p53-Mediated Signaling. *J Agric Food Chem*. 2016;64(36):6826-37.
743. Liu Y, Cao Y, Zhang W, Bergmeier S, Qian Y, Akbar H, et al. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(8):1672-82.
744. Jae HJ, Chung JW, Park HS, Lee MJ, Lee KC, Kim HC, et al. The antitumor effect and hepatotoxicity of a hexokinase II inhibitor 3-bromopyruvate: in vivo investigation of intraarterial administration in a rabbit VX2 hepatoma model. *Korean J Radiol*. 2009;10(6):596-603.
745. Li W, Zheng M, Wu S, Gao S, Yang M, Li Z, et al. Benserazide, a dopadecarboxylase inhibitor, suppresses tumor growth by targeting hexokinase 2. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):58.
746. Tao L, Wei L, Liu Y, Ding Y, Liu X, Zhang X, et al. Gen-27, a newly synthesized flavonoid, inhibits glycolysis and induces cell apoptosis via suppression of hexokinase II in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2017;125:12-25.
747. Dai W, Wang F, Lu J, Xia Y, He L, Chen K, et al. By reducing hexokinase 2, resveratrol induces apoptosis in HCC cells addicted to aerobic glycolysis and inhibits tumor growth in mice. *Oncotarget*. 2015;6(15):13703-17.
748. Li W, Hao J, Zhang L, Cheng Z, Deng X, Shu G. Astragalins Reduce Hexokinase 2 through Increasing miR-125b to Inhibit the Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo. *J Agric Food Chem*. 2017;65(29):5961-72.
749. Xu D, Jin J, Yu H, Zhao Z, Ma D, Zhang C, et al. Chrysin inhibited tumor glycolysis and induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting hexokinase-2. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):44.
750. Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;53(2):116-22.
751. Kim W, Yoon JH, Jeong JM, Cheon GJ, Lee TS, Yang JI, et al. Apoptosis-inducing antitumor efficacy of hexokinase II inhibitor in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(9):2554-62.
752. Wu H, Wang Y, Wu C, Yang P, Li H, Li Z. Resveratrol Induces Cancer Cell Apoptosis through MiR-326/PKM2-Mediated ER Stress and Mitochondrial Fission. *J Agric Food Chem*. 2016;64(49):9356-67.
753. Shan S, Shi J, Yang P, Jia B, Wu H, Zhang X, et al. Apigenin Restrains Colon Cancer Cell Proliferation via Targeted Blocking of Pyruvate Kinase M2-Dependent Glycolysis. *J Agric Food Chem*. 2017;65(37):8136-44.
754. Leone RD, Zhao L, Englert JM, Sun IM, Oh MH, Sun IH, et al. Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to overcome tumor immune evasion. *Science*. 2019;366(6468):1013-21.
755. Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(4):890-901.
756. Lee P, Malik D, Perkons N, Huangyang P, Khare S, Rhoades S, et al. Targeting glutamine metabolism slows soft tissue sarcoma growth. *Nat Commun*. 2020;11(1):498.

757. Yuan L, Sheng X, Clark LH, Zhang L, Guo H, Jones HM, et al. Glutaminase inhibitor compound 968 inhibits cell proliferation and sensitizes paclitaxel in ovarian cancer. *Am J Transl Res*. 2016;8(10):4265-77.
758. Xie C, Jin J, Bao X, Zhan WH, Han TY, Gan M, et al. Inhibition of mitochondrial glutaminase activity reverses acquired erlotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(1):610-21.
759. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, et al. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res*. 2010;70(22):8981-7.
760. Shukla K, Ferraris DV, Thomas AG, Stathis M, Duvall B, Delahanty G, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide 3 (BPTES) analogs as glutaminase inhibitors. *J Med Chem*. 2012;55(23):10551-63.
761. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*. 2013;340(6132):622-6.
762. Wu F, Jiang H, Zheng B, Kogiso M, Yao Y, Zhou C, et al. Inhibition of Cancer-Associated Mutant Isocitrate Dehydrogenases by 2-Thiohydantoin Compounds. *J Med Chem*. 2015;58(17):6899-908.
763. Popovici-Muller J, Saunders JO, Salituro FG, Travins JM, Yan S, Zhao F, et al. Discovery of the First Potent Inhibitors of Mutant IDH1 That Lower Tumor 2-HG in Vivo. *ACS Med Chem Lett*. 2012;3(10):850-5.
764. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*. 2013;340(6132):626-30.
765. Jones S, Ahmet J, Ayton K, Ball M, Cockerill M, Fairweather E, et al. Discovery and Optimization of Allosteric Inhibitors of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 (R132H IDH1) Displaying Activity in Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *J Med Chem*. 2016;59(24):11120-37.
766. Yang KC, Tsai CY, Wang YJ, Wei PL, Lee CH, Chen JH, et al. Apple polyphenol phloretin potentiates the anticancer actions of paclitaxel through induction of apoptosis in human hep G2 cells. *Mol Carcinog*. 2009;48(5):420-31.
767. Cao X, Fang L, Gibbs S, Huang Y, Dai Z, Wen P, et al. Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;59(4):495-505.
768. Chong D, Ma L, Liu F, Zhang Z, Zhao S, Huo Q, et al. Synergistic antitumor effect of 3-bromopyruvate and 5-fluorouracil against human colorectal cancer through cell cycle arrest and induction of apoptosis. *Anticancer Drugs*. 2017;28(8):831-40.
769. Ihrlund LS, Hernlund E, Khan O, Shoshan MC. 3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs. *Mol Oncol*. 2008;2(1):94-101.
770. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, Meunier G, Birsén R, Willems L, et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood*. 2015;126(11):1346-56.
771. Momcilovic M, Bailey ST, Lee JT, Fishbein MC, Magyar C, Braas D, et al. Targeted Inhibition of EGFR and Glutaminase Induces Metabolic Crisis in EGFR Mutant Lung Cancer. *Cell Rep*. 2017;18(3):601-10.
772. Yamaguchi R, Janssen E, Perkins G, Ellisman M, Kitada S, Reed JC. Efficient elimination of cancer cells by deoxyglucose-ABT-263/737 combination therapy. *PLoS One*. 2011;6(9):e24102.
773. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005;330(7503):1304-5.
774. Dowling RJ, Niraula S, Stambolic V, Goodwin PJ. Metformin in cancer: translational challenges. *J Mol Endocrinol*. 2012;48(3):R31-43.
775. Liu X, Romero IL, Litchfield LM, Lengyel E, Locasale JW. Metformin Targets Central Carbon Metabolism and Reveals Mitochondrial Requirements in Human Cancers. *Cell Metab*. 2016;24(5):728-39.
776. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000;348 Pt 3:607-14.
777. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*. 2000;275(1):223-8.
778. Shank JJ, Yang K, Ghannam J, Cabrera L, Johnston CJ, Reynolds RK, et al. Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol*. 2012;127(2):390-7.
779. Zhang R, Zhang P, Wang H, Hou D, Li W, Xiao G, et al. Inhibitory effects of metformin at low concentration on epithelial-mesenchymal transition of CD44(+)CD117(+) ovarian cancer stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:262.
780. Zordoky BN, Bark D, Soltys CL, Sung MM, Dyck JR. The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: implications for cancer therapy and prevention. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(6):1943-57.

781. Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, Yucel B, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature*. 2014;508(7494):108-12.
782. Cai H, Everett RS, Thakker DR. Efficacious dose of metformin for breast cancer therapy is determined by cation transporter expression in tumours. *Br J Pharmacol*. 2019;176(15):2724-35.
783. Madera D, Vitale-Cross L, Martin D, Schneider A, Molinolo AA, Gangane N, et al. Prevention of tumor growth driven by PIK3CA and HPV oncogenes by targeting mTOR signaling with metformin in oral squamous carcinomas expressing OCT3. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015;8(3):197-207.
784. Arrieta O, Barron F, Padilla MS, Aviles-Salas A, Ramirez-Tirado LA, Arguelles Jimenez MJ, et al. Effect of Metformin Plus Tyrosine Kinase Inhibitors Compared With Tyrosine Kinase Inhibitors Alone in Patients With Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated Lung Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2019;5(11):e192553.
785. Brown JR, Chan DK, Shank JJ, Griffith KA, Fan H, Szulawski R, et al. Phase II clinical trial of metformin as a cancer stem cell-targeting agent in ovarian cancer. *JCI Insight*. 2020;5(11).
786. Nanni O, Amadori D, De Censi A, Rocca A, Freschi A, Bologna A, et al. Metformin plus chemotherapy versus chemotherapy alone in the first-line treatment of HER2-negative metastatic breast cancer. The MYME randomized, phase 2 clinical trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;174(2):433-42.
787. Pimentel I, Lohmann AE, Ennis M, Dowling RJO, Cescon D, Elser C, et al. A phase II randomized clinical trial of the effect of metformin versus placebo on progression-free survival in women with metastatic breast cancer receiving standard chemotherapy. *Breast*. 2019;48:17-23.
788. Rohatgi N, Ghoshdastider U, Baruah P, Skanderup AJ. A pan-cancer metabolic atlas of the tumor microenvironment. *bioRxiv*. 2020:2020.10.16.342519.
789. Zhang X, Fryknas M, Herlund E, Fayad W, De Milito A, Olofsson MH, et al. Induction of mitochondrial dysfunction as a strategy for targeting tumour cells in metabolically compromised microenvironments. *Nat Commun*. 2014;5:3295.
790. Zhang L, Zhang J, Ye Z, Manevich Y, Ball LE, Bethard JR, et al. Isoflavone ME-344 Disrupts Redox Homeostasis and Mitochondrial Function by Targeting Heme Oxygenase 1. *Cancer Res*. 2019;79(16):4072-85.
791. Sakai T, Matsuo Y, Okuda K, Hirota K, Tsuji M, Hirayama T, et al. Development of antitumor biguanides targeting energy metabolism and stress responses in the tumor microenvironment. *Sci Rep*. 2021;11(1):4852.
792. Lee JS, Lee H, Jang H, Woo SM, Park JB, Lee SH, et al. Targeting Oxidative Phosphorylation Reverses Drug Resistance in Cancer Cells by Blocking Autophagy Recycling. *Cells*. 2020;9(9).
793. Navarro P, Bueno MJ, Zagorac I, Mondejar T, Sanchez J, Mouron S, et al. Targeting Tumor Mitochondrial Metabolism Overcomes Resistance to Antiangiogenics. *Cell Rep*. 2016;15(12):2705-18.
794. Haikala HM, Anttila JM, Marques E, Raatikainen T, Ilander M, Hakanen H, et al. Publisher Correction: Pharmacological reactivation of MYC-dependent apoptosis induces susceptibility to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Commun*. 2019;10(1):932.
795. Afzal MZ, Mercado RR, Shirai K. Efficacy of metformin in combination with immune checkpoint inhibitors (anti-PD-1/anti-CTLA-4) in metastatic malignant melanoma. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):64.
796. Kim SH, Li M, Trousil S, Zhang Y, Pasca di Magliano M, Swanson KD, et al. Phenformin Inhibits Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Anti-Tumor Activity of PD-1 Blockade in Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2017;137(8):1740-8.
797. Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*. 2012;72(21):5588-99.
798. Pommier Y, O'Connor MJ, de Bono J. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med*. 2016;8(362):362ps17.
799. Murata MM, Kong X, Moncada E, Chen Y, Imamura H, Wang P, et al. NAD⁺ consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival. *Mol Biol Cell*. 2019;30(20):2584-97.
800. Lahiguera A, Hyrossova P, Figueras A, Garzon D, Moreno R, Soto-Cerrato V, et al. Tumors defective in homologous recombination rely on oxidative metabolism: relevance to treatments with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med*. 2020;12(6):e11217.
801. Bajrami I, Kigozi A, Van Weverwijk A, Brough R, Frankum J, Lord CJ, et al. Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2012;4(10):1087-96.
802. Liu Z, Yan S, Wang J, Xu Y, Wang Y, Zhang S, et al. Endothelial adenosine A2a receptor-mediated glycolysis is essential for pathological retinal angiogenesis. *Nat Commun*. 2017;8(1):584.
803. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999;98(1):115-24.

804. Xing F, Luan Y, Cai J, Wu S, Mai J, Gu J, et al. The Anti-Warburg Effect Elicited by the cAMP-PGC1alpha Pathway Drives Differentiation of Glioblastoma Cells into Astrocytes. *Cell Rep*. 2018;23(9):2832-3.
805. Gerhart-Hines Z, Dominy JE, Jr., Blattler SM, Jedrychowski MP, Banks AS, Lim JH, et al. The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD(+). *Mol Cell*. 2011;44(6):851-63.
806. Aroua N, Boet E, Ghisi M, Nicolau-Travers ML, Saland E, Gwilliam R, et al. Extracellular ATP and CD39 Activate cAMP-Mediated Mitochondrial Stress Response to Promote Cytarabine Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*. 2020;10(10):1544-65.
807. Palorini R, De Rasio D, Gaviraghi M, Sala Danna L, Signorile A, Cirulli C, et al. Oncogenic K-ras expression is associated with derangement of the cAMP/PKA pathway and forskolin-reversible alterations of mitochondrial dynamics and respiration. *Oncogene*. 2013;32(3):352-62.
808. Briceno P, Rivas-Yanez E, Roseblatt MV, Parra-Tello B, Farias P, Vargas L, et al. CD73 Ectonucleotidase Restrains CD8+ T Cell Metabolic Fitness and Anti-tumoral Activity. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:638037.
809. Wang T, Gnanaprakasam JNR, Chen X, Kang S, Xu X, Sun H, et al. Inosine is an alternative carbon source for CD8(+)-T-cell function under glucose restriction. *Nat Metab*. 2020;2(7):635-47.
810. Chambers AM, Wang J, Lupo KB, Yu H, Atallah Lanman NM, Matosevic S. Adenosinergic Signaling Alters Natural Killer Cell Functional Responses. *Front Immunol*. 2018;9:2533.
811. Zhu Z, Li R, Li H, Zhou T, Davis RS. FCRL5 exerts binary and compartment-specific influence on innate-like B-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(14):E1282-90.
812. Pone EJ, Zhang J, Mai T, White CA, Li G, Sakakura JK, et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-kappaB pathway. *Nat Commun*. 2012;3:767.
813. Pene J, Gauchat JF, Lecart S, Drouet E, Guglielmi P, Boulay V, et al. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J Immunol*. 2004;172(9):5154-7.
814. Hamidzadeh K, Mosser DM. Purinergic Signaling to Terminate TLR Responses in Macrophages. *Front Immunol*. 2016;7:74.
815. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. 2001;14(5):617-29.
816. Salmi M, Jalkanen S. Homing-associated molecules CD73 and VAP-1 as targets to prevent harmful inflammations and cancer spread. *FEBS Lett*. 2011;585(11):1543-50.
817. Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med*. 2004;200(9):1145-56.
818. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(1):145-53.
819. Rozman C, Montserrat E, Vinolas N. Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer*. 1988;61(2):279-83.
820. Sinisalo M, Vilpo J, Itala M, Vakevainen M, Taurio J, Aittoniemi J. Antibody response to 7-valent conjugated pneumococcal vaccine in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Vaccine*. 2007;26(1):82-7.
821. Pasiarski M, Rolinski J, Grywalska E, Stelmach-Goldys A, Korona-Glowniak I, Gozdz S, et al. Antibody and plasmablast response to 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in chronic lymphocytic leukemia patients--preliminary report. *PLoS One*. 2014;9(12):e114966.
822. Svensson T, Kattstrom M, Hammarlund Y, Roth D, Andersson PO, Svensson M, et al. Pneumococcal conjugate vaccine triggers a better immune response than pneumococcal polysaccharide vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia A randomized study by the Swedish CLL group. *Vaccine*. 2018;36(25):3701-7.
823. Sinisalo M, Aittoniemi J, Oivanen P, Kayhty H, Olander RM, Vilpo J. Response to vaccination against different types of antigens in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;114(1):107-10.
824. Hartkamp A, Mulder AH, Rijkers GT, van Velzen-Blad H, Biesma DH. Antibody responses to pneumococcal and haemophilus vaccinations in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Vaccine*. 2001;19(13-14):1671-7.
825. Safdar A, Rodriguez GH, Rueda AM, Wierda WG, Ferrajoli A, Musher DM, et al. Multiple-dose granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor plus 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia: a prospective, randomized trial of safety and immunogenicity. *Cancer*. 2008;113(2):383-7.
826. Lindstrom V, Aittoniemi J, Salmenniemi U, Kayhty H, Huhtala H, Sinisalo M. Antibody response to the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine after conjugate vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(12):2910-3.

827. Thangavadiel S, Zhao Q, Epperla N, Rike L, Mo X, Badawi M, et al. Early Intervention with Lenalidomide in Patients with High-risk Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2020;26(23):6187-95.
828. Van der Velden AM, Van Velzen-Blad H, Claessen AM, Van der Griend R, Oltmans R, Rijkers GT, et al. The effect of ranitidine on antibody responses to polysaccharide vaccines in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 2007;79(1):47-52.
829. Mauro FR, Giannarelli D, Galluzzo CM, Vitale C, Visentin A, Riemma C, et al. Response to the conjugate pneumococcal vaccine (PCV13) in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia.* 2021;35(3):737-46.
830. McClanahan F, Riches JC, Miller S, Day WP, Kotsiou E, Neuberg D, et al. Mechanisms of PD-L1/PD-1-mediated CD8 T-cell dysfunction in the context of aging-related immune defects in the Emicro-TCL1 CLL mouse model. *Blood.* 2015;126(2):212-21.
831. Gassner FJ, Zaborsky N, Catakovic K, Rebhandl S, Huemer M, Egle A, et al. Chronic lymphocytic leukaemia induces an exhausted T cell phenotype in the TCL1 transgenic mouse model. *Br J Haematol.* 2015;170(4):515-22.
832. Hofbauer JP, Heyder C, Denk U, Kocher T, Holler C, Trapin D, et al. Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL. *Leukemia.* 2011;25(9):1452-8.
833. Asslaber D, Qi Y, Maeding N, Steiner M, Denk U, Hopner JP, et al. B-cell-specific IRF4 deletion accelerates chronic lymphocytic leukemia development by enhanced tumor immune evasion. *Blood.* 2019;134(20):1717-29.
834. Grioni M, Brevi A, Cattaneo E, Rovida A, Bordini J, Bertilaccio MTS, et al. CD4+ T cells sustain aggressive chronic lymphocytic leukemia in Emu-TCL1 mice through a CD40L-independent mechanism. *Blood Adv.* 2021;5(14):2817-28.
835. Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, et al. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol.* 2005;175(12):8260-70.
836. Kosco B, Csoka B, Selmezy Z, Himer L, Pacher P, Virag L, et al. Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *J Immunol.* 2012;188(1):445-53.
837. Torres-Pineda DB, Mora-Garcia ML, Garcia-Rocha R, Hernandez-Montes J, Weiss-Steider B, Montesinos-Montesinos JJ, et al. Adenosine augments the production of IL-10 in cervical cancer cells through interaction with the A2B adenosine receptor, resulting in protection against the activity of cytotoxic T cells. *Cytokine.* 2020;130:155082.
838. Kowalska W, Bojarska-Junak A. Monocytic MDSC as a source of immunosuppressive cytokines in chronic lymphocytic leukemia (CLL) microenvironment. *Folia Histochem Cytobiol.* 2020;58(1):25-36.
839. Alhakeem SS, McKenna MK, Oben KZ, Noothi SK, Rivas JR, Hildebrandt GC, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia-Derived IL-10 Suppresses Antitumor Immunity. *J Immunol.* 2018;200(12):4180-9.
840. Yakimchuk K, Norin S, Kimby E, Hagglund H, Warner M, Gustafsson JA. Up-regulated estrogen receptor beta2 in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(1):139-44.
841. Alcedo KP, Rouse MA, Jung GS, Fu D, Minor M, Willcockson HH, et al. CD73 Maintains Hepatocyte Metabolic Integrity and Mouse Liver Homeostasis in a Sex-Dependent Manner. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021;12(1):141-57.
842. Ray AL, Nofchissey RA, Khan MA, Reidy MA, Lerner MR, Wu X, et al. The role of sex in the innate and adaptive immune environment of metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2020;123(4):624-32.
843. Liu KA, Mager NA. Women's involvement in clinical trials: historical perspective and future implications. *Pharm Pract (Granada).* 2016;14(1):708.
844. Roy Chowdhury S, Bouchard EDJ, Saleh R, Nugent Z, Peltier C, Mejia E, et al. Mitochondrial Respiration Correlates with Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia and Is Normalized by Ibrutinib Treatment. *Cancers (Basel).* 2020;12(3).
845. Vangapandu HV, Havranek O, Ayres ML, Kaipparattu BA, Balakrishnan K, Wierda WG, et al. B-cell Receptor Signaling Regulates Metabolism in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mol Cancer Res.* 2017;15(12):1692-703.
846. Rozovski U, Grgurevic S, Bueso-Ramos C, Harris DM, Li P, Liu Z, et al. Aberrant LPL Expression, Driven by STAT3, Mediates Free Fatty Acid Metabolism in CLL Cells. *Mol Cancer Res.* 2015;13(5):944-53.
847. Adekola KU, Dalva Aydemir S, Ma S, Zhou Z, Rosen ST, Shanmugam M. Investigating and targeting chronic lymphocytic leukemia metabolism with the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and metformin. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(2):450-9.
848. Jitschin R, Hofmann AD, Bruns H, Giessel A, Bricks J, Berger J, et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;123(17):2663-72.

849. Vangapandu HV, Ayres ML, Bristow CA, Wierda WG, Keating MJ, Balakrishnan K, et al. The Stromal Microenvironment Modulates Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Neoplasia*. 2017;19(10):762-71.
850. Ravera S, Ghiotto F, Tenca C, Gugiatti E, Santamaria S, Ledda B, et al. Berberine affects mitochondrial activity and cell growth of leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia patients. *Sci Rep*. 2020;10(1):16519.
851. Vangapandu HV, Alston B, Morse J, Ayres ML, Wierda WG, Keating MJ, et al. Biological and metabolic effects of IACS-010759, an OxPhos inhibitor, on chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget*. 2018;9(38):24980-91.
852. Silaidos C, Pilatus U, Grewal R, Matura S, Lienerth B, Pantel J, et al. Sex-associated differences in mitochondrial function in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and brain. *Biol Sex Differ*. 2018;9(1):34.
853. Cardinale DA, Larsen FJ, Schiffer TA, Morales-Alamo D, Ekblom B, Calbet JAL, et al. Superior Intrinsic Mitochondrial Respiration in Women Than in Men. *Front Physiol*. 2018;9:1133.
854. Farhat F, Amerand A, Simon B, Guegueniat N, Moisan C. Gender-dependent differences of mitochondrial function and oxidative stress in rat skeletal muscle at rest and after exercise training. *Redox Rep*. 2017;22(6):508-14.
855. Khalifa AR, Abdel-Rahman EA, Mahmoud AM, Ali MH, Noureldin M, Saber SH, et al. Sex-specific differences in mitochondria biogenesis, morphology, respiratory function, and ROS homeostasis in young mouse heart and brain. *Physiol Rep*. 2017;5(6).
856. Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochem J*. 2001;358(Pt 1):69-77.
857. Cerniglia GJ, Dey S, Gallagher-Colombo SM, Daurio NA, Tuttle S, Busch TM, et al. The PI3K/Akt Pathway Regulates Oxygen Metabolism via Pyruvate Dehydrogenase (PDH)-E1alpha Phosphorylation. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(8):1928-38.
858. Xu S, Wang J, Zhong J, Shao M, Jiang J, Song J, et al. CD73 alleviates GSDMD-mediated microglia pyroptosis in spinal cord injury through PI3K/AKT/Foxo1 signaling. *Clin Transl Med*. 2021;11(1):e269.
859. Turgeon MO, Perry NJS, Pouligiannis G. DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Front Oncol*. 2018;8:15.
860. Kitabatake K, Yoshida E, Kaji T, Tsukimoto M. Involvement of adenosine A2B receptor in radiation-induced translocation of epidermal growth factor receptor and DNA damage response leading to radioresistance in human lung cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2020;1864(1):129457.
861. Tanaka Y, Kitabatake K, Abe R, Tsukimoto M. Involvement of A2B Receptor in DNA Damage Response and Radiosensitizing Effect of A2B Receptor Antagonists on Mouse B16 Melanoma. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(3):516-25.
862. Kitabatake K, Kaji T, Tsukimoto M. Involvement of CD73 and A2B Receptor in Radiation-Induced DNA Damage Response and Cell Migration in Human Glioblastoma A172 Cells. *Biol Pharm Bull*. 2021;44(2):197-210.
863. Elliott IA, Dann AM, Xu S, Kim SS, Abt ER, Kim W, et al. Lysosome inhibition sensitizes pancreatic cancer to replication stress by aspartate depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(14):6842-7.
864. Patel D, Menon D, Bernfeld E, Mroz V, Kalan S, Loayza D, et al. Aspartate Rescues S-phase Arrest Caused by Suppression of Glutamine Utilization in KRas-driven Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2016;291(17):9322-9.
865. Okazaki A, Gameiro PA, Christodoulou D, Laviollette L, Schneider M, Chaves F, et al. Glutaminase and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors suppress pyrimidine synthesis and VHL-deficient renal cancers. *J Clin Invest*. 2017;127(5):1631-45.
866. Motwani M, Pesiridis S, Fitzgerald KA. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):657-74.
867. Marcus A, Mao AJ, Lensink-Vasan M, Wang L, Vance RE, Raulet DH. Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. *Immunity*. 2018;49(4):754-63 e4.
868. Ding L, Kim HJ, Wang Q, Kearns M, Jiang T, Ohlson CE, et al. PARP Inhibition Elicits STING-Dependent Antitumor Immunity in Brca1-Deficient Ovarian Cancer. *Cell Rep*. 2018;25(11):2972-80 e5.
869. Lohard S, Bourgeois N, Maillat L, Gautier F, Fetiveau A, Lasla H, et al. STING-dependent paracrine shapes apoptotic priming of breast tumors in response to anti-mitotic treatment. *Nat Commun*. 2020;11(1):259.
870. Sprenger HG, MacVicar T, Bahat A, Fiedler KU, Hermans S, Ehrentraut D, et al. Cellular pyrimidine imbalance triggers mitochondrial DNA-dependent innate immunity. *Nat Metab*. 2021.
871. Giddings EL, Champagne DP, Wu MH, Laffin JM, Thornton TM, Valenca-Pereira F, et al. Mitochondrial ATP fuels ABC transporter-mediated drug efflux in cancer chemoresistance. *Nat Commun*. 2021;12(1):2804.

872. Xie N, Zhang L, Gao W, Huang C, Huber PE, Zhou X, et al. NAD(+) metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):227.
873. Chmielewski JP, Bowlby SC, Wheeler FB, Shi L, Sui G, Davis AL, et al. CD38 Inhibits Prostate Cancer Metabolism and Proliferation by Reducing Cellular NAD(+) Pools. *Mol Cancer Res.* 2018;16(11):1687-700.
874. Fan J, Hitosugi T, Chung TW, Xie J, Ge Q, Gu TL, et al. Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2011;31(24):4938-50.
875. Nacarelli T, Fukumoto T, Zundell JA, Fatkhutdinov N, Jean S, Cadungog MG, et al. NAMPT Inhibition Suppresses Cancer Stem-like Cells Associated with Therapy-Induced Senescence in Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2020;80(4):890-900.
876. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):2236-52.
877. Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, Harms GM, Shen H, Wang LS, et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature.* 2009;460(7251):103-7.
878. Ding L, Liang G, Yao Z, Zhang J, Liu R, Chen H, et al. Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget.* 2015;6(34):36441-55.
879. Uehara T, Eikawa S, Nishida M, Kunisada Y, Yoshida A, Fujiwara T, et al. Metformin induces CD11b+-cell-mediated growth inhibition of an osteosarcoma: implications for metabolic reprogramming of myeloid cells and anti-tumor effects. *Int Immunol.* 2019;31(4):187-98.
880. Pereira FV, Melo ACL, Low JS, de Castro IA, Braga TT, Almeida DC, et al. Metformin exerts antitumor activity via induction of multiple death pathways in tumor cells and activation of a protective immune response. *Oncotarget.* 2018;9(40):25808-25.
881. Kunisada Y, Eikawa S, Tomonobu N, Domae S, Uehara T, Hori S, et al. Attenuation of CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment by Metformin, a Type 2 Diabetes Drug. *EBioMedicine.* 2017;25:154-64.
882. Li L, Wang L, Li J, Fan Z, Yang L, Zhang Z, et al. Metformin-Induced Reduction of CD39 and CD73 Blocks Myeloid-Derived Suppressor Cell Activity in Patients with Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2018;78(7):1779-91.
883. Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udono H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(6):1809-14.
884. Scharping NE, Menk AV, Whetstone RD, Zeng X, Delgoffe GM. Efficacy of PD-1 Blockade Is Potentiated by Metformin-Induced Reduction of Tumor Hypoxia. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(1):9-16.
885. Pinkus LM. Glutamine binding sites. *Methods Enzymol.* 1977;46:414-27.
886. Kohan AB, Talukdar I, Walsh CM, Salati LM. A role for AMPK in the inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388(1):117-21.
887. Chaube B, Malvi P, Singh SV, Mohammad N, Viollet B, Bhat MK. AMPK maintains energy homeostasis and survival in cancer cells via regulating p38/PGC-1alpha-mediated mitochondrial biogenesis. *Cell Death Discov.* 2015;1:15063.
888. Chaube B, Bhat MK. AMPK, a key regulator of metabolic/energy homeostasis and mitochondrial biogenesis in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2044.
889. Faraoni I, Graziani G. Role of BRCA Mutations in Cancer Treatment with Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors. *Cancers (Basel).* 2018;10(12).
890. Chen Q, Bian C, Wang X, Liu X, Ahmad Kassab M, Yu Y, et al. ADP-ribosylation of histone variant H2AX promotes base excision repair. *EMBO J.* 2021;40(2):e104542.
891. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(8):852-61.
892. Lagziel S, Gottlieb E, Shlomi T. Mind your media. *Nat Metab.* 2020;2(12):1369-72.
893. Yu J, Wang X, Lu Q, Wang J, Li L, Liao X, et al. Extracellular 5'-nucleotidase (CD73) promotes human breast cancer cells growth through AKT/GSK-3beta/beta-catenin/cyclinD1 signaling pathway. *Int J Cancer.* 2018;142(5):959-67.
894. Sullivan LB, Luengo A, Danai LV, Bush LN, Diehl FF, Hosios AM, et al. Aspartate is an endogenous metabolic limitation for tumour growth. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):782-8.
895. Schiff M, Benit P, Coulibaly A, Loublier S, El-Khoury R, Rustin P. Mitochondrial response to controlled nutrition in health and disease. *Nutr Rev.* 2011;69(2):65-75.
896. Ghezzi D, Zeviani M. Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. *Essays Biochem.* 2018;62(3):271-86.

897. Ait-Aissa K, Blaszk SC, Beutner G, Tsaih SW, Morgan G, Santos JH, et al. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation defect in the Heart of Subjects with Coronary Artery Disease. *Sci Rep.* 2019;9(1):7623.
898. Wang M, Wang XC, Zhang ZY, Mou B, Hu RM. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in multiple insulin-sensitive tissues of humans with type 2 diabetes mellitus. *J Int Med Res.* 2010;38(3):769-81.
899. Sukumar M, Liu J, Ji Y, Subramanian M, Crompton JG, Yu Z, et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8⁺ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest.* 2013;123(10):4479-88.
900. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity.* 2011;35(6):871-82.
901. Kempkes RWM, Joosten I, Koenen H, He X. Metabolic Pathways Involved in Regulatory T Cell Functionality. *Front Immunol.* 2019;10:2839.
902. Vardhana SA, Hwee MA, Berisa M, Wells DK, Yost KE, King B, et al. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation limits the self-renewal of T cells exposed to persistent antigen. *Nat Immunol.* 2020;21(9):1022-33.
903. Yu YR, Imrichova H, Wang H, Chao T, Xiao Z, Gao M, et al. Disturbed mitochondrial dynamics in CD8⁺ TILs reinforce T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2020;21(12):1540-51.
904. Guo Y, Xie YQ, Gao M, Zhao Y, Franco F, Wenes M, et al. Metabolic reprogramming of terminally exhausted CD8⁺ T cells by IL-10 enhances anti-tumor immunity. *Nat Immunol.* 2021.
905. Chatterjee S, Daenthanasamak A, Chakraborty P, Wyatt MW, Dhar P, Selvam SP, et al. CD38-NAD⁺ Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metab.* 2018;27(1):85-100 e8.
906. Kong Y, Jia B, Zhao C, Claxton DF, Sharma A, Annageldiyev C, et al. Downregulation of CD73 associates with T cell exhaustion in AML patients. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):40.
907. Doherty GA, Bai A, Hanidziar D, Longhi MS, Lawlor GO, Putheti P, et al. CD73 is a phenotypic marker of effector memory Th17 cells in inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol.* 2012;42(11):3062-72.
908. Hernandez-Mir G, McGeachy MJ. CD73 is expressed by inflammatory Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis but does not limit differentiation or pathogenesis. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173655.
909. Flores-Santibanez F, Fernandez D, Meza D, Tejon G, Vargas L, Varela-Nallar L, et al. CD73-mediated adenosine production promotes stem cell-like properties in mouse Tc17 cells. *Immunology.* 2015;146(4):582-94.
910. Yang L, Kobie JJ, Mosmann TR. CD73 and Ly-6A/E distinguish in vivo primed but uncommitted mouse CD4 T cells from type 1 or type 2 effector cells. *J Immunol.* 2005;175(10):6458-64.
911. Bono MR, Fernandez D, Flores-Santibanez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* 2015;589(22):3454-60.
912. Roseblatt MV, Parra-Tello B, Briceno P, Rivas-Yanez E, Tucer S, Saavedra-Almarza J, et al. Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Regulates the Survival of CD8⁺ T Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:647058.
913. Angelin A, Gil-de-Gomez L, Dahiya S, Jiao J, Guo L, Levine MH, et al. Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* 2017;25(6):1282-93 e7.
914. Watson MJ, Vignali PDA, Mullett SJ, Overacre-Delgoffe AE, Peralta RM, Grebinoski S, et al. Metabolic support of tumour-infiltrating regulatory T cells by lactic acid. *Nature.* 2021;591(7851):645-51.
915. Wang H, Franco F, Tsui YC, Xie X, Trefny MP, Zappasodi R, et al. CD36-mediated metabolic adaptation supports regulatory T cell survival and function in tumors. *Nat Immunol.* 2020;21(3):298-308.
916. Price MJ, Patterson DG, Scharer CD, Boss JM. Progressive Upregulation of Oxidative Metabolism Facilitates Plasmablast Differentiation to a T-Independent Antigen. *Cell Rep.* 2018;23(11):3152-9.
917. Waters LR, Ahsan FM, Wolf DM, Shirihai O, Teitell MA. Initial B Cell Activation Induces Metabolic Reprogramming and Mitochondrial Remodeling. *iScience.* 2018;5:99-109.
918. Weisel FJ, Mullett SJ, Elsner RA, Menk AV, Trivedi N, Luo W, et al. Germinal center B cells selectively oxidize fatty acids for energy while conducting minimal glycolysis. *Nat Immunol.* 2020;21(3):331-42.
919. Clarke AJ, Riffelmacher T, Braas D, Cornall RJ, Simon AK. B1a B cells require autophagy for metabolic homeostasis and self-renewal. *J Exp Med.* 2018;215(2):399-413.
920. Justice MJ, Dhillon P. Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Dis Model Mech.* 2016;9(2):101-3.
921. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature.* 2016;532(7600):512-6.
922. Koch M, Reinartz S, Saggau J, Knittel G, Rosen N, Fedorchenko O, et al. Meta-Analysis Reveals Significant Sex Differences in Chronic Lymphocytic Leukemia Progression in the Emicro-TCL1 Transgenic Mouse Model. *Cancers (Basel).* 2020;12(7).
923. Joolharzadeh P, St Hilaire C. CD73 (Cluster of Differentiation 73) and the Differences Between Mice and Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(3):339-48.

924. Li Q, Price TP, Sundberg JP, Uitto J. Juxta-articular joint-capsule mineralization in CD73 deficient mice: similarities to patients with NT5E mutations. *Cell Cycle*. 2014;13(16):2609-15.
925. Soderback U, Sollevi A, Fredholm BB. The disappearance of adenosine from blood and platelet suspension in relation to the platelet cyclic AMP content. *Acta Physiol Scand*. 1987;129(2):189-94.
926. Muir A, Danai LV, Vander Heiden MG. Microenvironmental regulation of cancer cell metabolism: implications for experimental design and translational studies. *Dis Model Mech*. 2018;11(8).
927. Russell S, Wojtkowiak J, Neilson A, Gillies RJ. Metabolic Profiling of healthy and cancerous tissues in 2D and 3D. *Sci Rep*. 2017;7(1):15285.
928. Martinez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(10):669-80.
929. Yang L, Achreja A, Yeung TL, Mangala LS, Jiang D, Han C, et al. Targeting Stromal Glutamine Synthetase in Tumors Disrupts Tumor Microenvironment-Regulated Cancer Cell Growth. *Cell Metab*. 2016;24(5):685-700.
930. Mukherjee S. *The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer*. United States: Scribner; 2010 16 novembre 2010. 592 p.
931. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol*. 2018;9:1300.
932. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*. 2013;342(6165):1432-3.

Annexes

Liste des publications :

- **High-dimensional analysis of the adenosine pathway in high grade serous ovarian cancer (2021).** Yacine Bareche*, Sandra Pommey*, Mayra Carneiro*, Laurence Buisseret, Isabelle Cousineau, Paméla Thébault, Pavel Chrobak, Laudine Communal, **David Allard**, Simon C. Robson, Anne-Marie Mes-Masson, Diane Provencher, Réjean Lapointe# and John Stagg#. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2021 Mar;9(3):e001965.doi: 10.1136/jitc-2020-001965 (*contributed equally. #co-senior authors).
- **DNA hypomethylating agents increase activation and cytolytic activity of CD8+ T-cells (2021).** Helen Loo Yau*, Emma Bell*, Ilias Ettayebi, Felipe Campos de Almeida, Giselle M. Boukhaled, Shu Yi Shen, **David Allard**, Beatriz Morancho, Sajid A. Marhon, Charles A. Ishak, Isabela Gonzaga, Tiago Medina, Rajat Singhanian, Ankur Chakravarthy, Raymond Chen, Parinaz Mehdipour, Sandra Pommey, Christian Klein, Gustavo Amarante-Mendes, David Roulois, Joaquín Arribas, John Stagg, David G. Brooks, Daniel D. De Carvalho. *Molecular Cell*, 2021 Apr 1;81(7):1469-1483.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2021.01.038. Epub 2021 Feb 19 (*contributed equally)
- **The adenosine pathway in immuno-oncology (2020).** Bertrand Allard, **David Allard**, Laurence Buisseret and John Stagg. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2020 Jun 8. doi:0.1038/s41571-020-0382-2.
- **On the mechanism of anti-CD39 immune checkpoint therapy (2020).** **David Allard**, Bertrand Allard and John Stagg. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2020;8:e000186. doi:10.1136/jitc-2019-000186.
- **Targeting the adenosine pathway for cancer immunotherapy (2019).** Akil Hamami*, **David Allard***, Bertrand Allard* and John Stagg. *Seminars in Immunology*, 2019 Apr;42:101304. doi: 10.1016/j.smim.2019.101304 (*contributed equally)
- **Adenosine A2a receptor promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis (2019).** Bertrand Allard, Isabelle Cousineau, **David Allard**, Laurence Buisseret, Sandra Pommey, Pavel Chrobak & John Stagg. *Oncoimmunology*, 2019 Apr 26;8(8):1601481. doi: 10.1080/2162402X.2019.1601481.
- **Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology (2018).** **David Allard**, Pavel Chrobak, Bertrand Allard, Nourredin Messaoudi and John Stagg. *Immunology Letters*; 2019 Jan;205:31-39. doi: 10.1016/j.imlet.2018.05.001.

- **CD73-A2a adenosine receptor axis promotes innate B cell antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccination (2018).** David Allard, Roxanne Charlebois, Loïse Gilbert, John Stagg* and Pavel Chrobak*. *PLoS One*; Vol 13(1); e0191973 (*contributed equally)
- **Targeting A2 adenosine receptors in cancer (2017).** David Allard, Martin Turcotte, and John Stagg. *Immunology and Cell Biology*; p1-7
- **CD73 Promotes Resistance to HER2/ErbB2 Antibody Therapy (2017).** Martin Turcotte, David Allard, Deepak Mittal, Yacine Bareche, Laurence Buisseret, Vinu Jose, Sandra Pommey, Vincent Delisle, Sherene Loi, Heikki Joensuu, Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen, Christos Sotiriou, Mark J. Smyth, and John Stagg. *Cancer Research*; Vol. 77(20); pOF1-OF12.
- **PolyI:C and CpG Synergize with Anti-ErbB2 mAb for Treatment of Breast Tumors Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors (2017).** Roxanne Charlebois, Bertrand Allard, David Allard, Laurence Buisseret, Martin Turcotte, Sandra Pommey, Pavel Chrobak, and John Stagg. *Cancer Research*; Vol. 77(2); p312-319
- **CD73-adenosine: next generation immune checkpoint in immuno-oncology (2016).** David Allard, Bertrand Allard, Pierre-Olivier Gaudreau, Pavel Chrobak, and John Stagg. *Immunotherapy (Future Medicine)*; Vol. 8(2); p145-163
- **Methods to Evaluate the Antitumor Activity of Immune Checkpoint Inhibitors in Preclinical Studies (2016).** Bertrand Allard, David Allard, and John Stagg. *Methods in Molecular Biology*; Vol 1458; p159-177