

Université de Montréal

*L'obésité accélère le développement du cancer faiblement immunogène en induisant de la
sénescence tumorale*

Par

Frédéric Fournier

Département de biochimie, Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Ph.D.

en Biochimie, option Cheminement général

Avril 2022

© Frédéric Fournier, 2022

Université de Montréal

Unité académique : Département de Biochimie, Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

L'obésité accélère le développement du cancer faiblement immunogène en induisant de la sénescence tumorale

Présenté par

Frédéric Fournier

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Prénom Nom

Dr Luis Rokeach

Prénom Nom

Dr Przemyslaw (Mike) Sapieha

Prénom Nom

Dr Mathieu Ferron

Prénom Nom

Dre Ajitha Thanabalasuriar

Résumé

L'obésité est un facteur de risque majeur de cancer. Il est connu qu'une adiposité élevée prédispose à un stress inflammatoire accru et potentialise la croissance tumorale. Néanmoins, les mécanismes restent mal définis. De façon intéressante, la sénescence cellulaire, ou le programme moléculaire causant l'arrêt du cycle cellulaire suite à un stress insurmontable, favorise l'inflammation chronique et délétère pendant l'obésité. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'obésité puisse être un inducteur de sénescence protumoral qu'il est possible d'exploiter, via une stratégie sénolytique, pour ralentir ou même bloquer le développement de tumeurs. Grâce à des marquages de coupes histologiques de tumeurs métastatiques, nous avons montré que les masses malignes de patients ayant un indice de masse corporelle (IMC) >35 sont associées à des marqueurs de sénescence. Cette découverte suggère une charge élevée de cellules sénescents chez ses patients. Alors que la sénolyse, ou l'élimination thérapeutique des cellules sénescents, s'est révélée très prometteuse dans le traitement de plusieurs maladies liées à l'âge, son efficacité en tant que traitement du cancer est souvent mitigé et dépend des antécédents du patient. Dans notre étude, nous avons utilisé un modèle murin d'obésité induit par la diète combinée avec un modèle d'injections syngéniques de différentes lignées cancéreuses occasionnant des réponses immunogéniques faibles, légères ou hautes. Chez les souris sur une diète riche en gras, nous avons identifié des cellules cancéreuses sénescents spécifiquement dans les tumeurs faiblement immunogènes, soit faiblement reconnue par le système immunitaire et donc difficile à traiter. Un traitement sénolytique avec l'inhibiteur de la famille BCL-2 ABT-263 abolit la réponse protumorale observée via l'ablation des cellules cancéreuses sénescents. Ainsi, nous proposons que les thérapies combinatoires avec des agents sénolytiques devraient être envisagées pour traiter les patients cancéreux présentant une adiposité accrue. De plus, dans la même cohorte de patients où nous avons rapporté des marqueurs de sénescence dans les tissus malins, les patients obèses ont aussi montré une expression importante de Toll-like receptor 4 (TLR4). Nous avons donc émis l'hypothèse que le récepteur TLR4 joue un rôle important dans l'établissement d'un microenvironnement tumoral qui favorise la sénescence cellulaire et la croissance tumorale de souris en surplus de poids. Dans notre étude, nous rapportons que l'expression systémique de TLR4 est importante pour la croissance tumorale induite par l'obésité. Nous montrons également que

l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique médié par Inositol requiring enzyme 1 α (IRE1 α) dans les cellules myéloïdes associées à une tumeur, favorise la sénescence des cellules cancéreuses, dans un contexte de faible immunogénicité, via TLR4. Ce travail établit les fondements d'une compréhension moléculaire du lien entre les régimes à forte teneur calorique et l'immunité protumorale.

Mots-clés : Cancer, obésité, sénescence cellulaire, sénolyse, immunogénicité, Toll-like receptor (TLR)-4, cellule myéloïde, stress du réticulum endoplasmique, Inositol-requiring enzyme (IRE)-1 α .

Abstract

Obesity is a major risk factor for cancer. High adiposity predisposes to increased inflammatory stress, which potentiates tumor growth. However, the mechanisms remain poorly defined. Interestingly, cellular senescence, or the molecular program causing cell cycle arrest following insurmountable stress, is known to promote chronic and deleterious inflammation during obesity. We therefore hypothesized that obesity could be an inducer of a protumoral senescence that can be exploited, via a senolytic strategy, to slow down or even block tumor development. Through histological sections of metastatic tumor, we show that malignant masses from patients with a body mass index (BMI) >35 are associated with markers of senescence, suggesting a high burden of senescent cells in these patients. While senolysis, or the therapeutic elimination of senescent cells, has shown great promises in the treatment of several age-related diseases, its efficacy as a treatment for cancer is often elusive and depends on patients' history. In our study, we used a mouse model of diet-induced obesity (DIO) combined with a model of syngeneic injections of different cancer cell lines causing low, mild, or high immunogenic responses. In mice under a DIO, we have identified senescent cancer cells specifically in weakly immunogenic tumors, or tumors poorly recognized by the immune system, and therefore difficult to treat. Moreover, a senolytic treatment with the BCL-2 family inhibitor ABT-263 abolishes the protumor response seen in these mice via the ablation of senescent cancer cells. Thus, combination therapies using senolytic agents should fall into consideration to treat cancer patients with increased adiposity. In addition, in the same cohort of patients where we reported markers of senescence in malignant tissues, obese patients also showed significant expression of TLR4. We therefore hypothesized that the TLR4 receptor plays an important role in establishing a tumor microenvironment that promotes cellular senescence and tumor growth in mice subjected to experimental obesity. In our second study, we report that systemic expression of TLR4 is important for obesity-induced tumor growth. Moreover, we show that the induction of an IRE1 α -mediated endoplasmic reticulum stress, in tumor-associated myeloid cells, promotes the senescence of cancer cells, in a context of low immunogenicity, via TLR4. This work lays the foundation for a molecular understanding of the link between high-calorie diets and protumoral immunity.

Keywords: Cancer, obesity, cellular senescence, senolysis, immunogenicity, Toll-like receptor (TLR)-4, myeloid cell, ER stress, Inositol-requiring enzyme (IRE)-1 α .

Table des matières

RÉSUMÉ	5
ABSTRACT	7
TABLE DES MATIÈRES	9
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	19
REMERCIEMENTS	25
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	26
1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	26
1.2 L’OBÉSITÉ COMME FACTEUR DE RISQUE DU CANCER	27
1.3 LIEN MOLÉCULAIRE ENTRE CANCER ET OBÉSITÉ	29
1.3.1 BIODISPONIBILITÉ DES LIPIDES	29
1.3.2 SIGNALISATION DE L’INSULINE	31
1.3.3 DYSBIOSE	33
1.3.4 ADIPOKINES, HORMONES ET PRINCIPALES PROTÉINES SUREXPRIMÉES DANS L’OBÉSITÉ	35
Adiponectine	36
Leptine	36
Resistin et Visfatine	37
Œstrogène	37
Endotrophine, Ostéopontine et YKL-40	38

1.3.5 INFLAMMATION	39
Cytokines pro-inflammatoires principales	39
Mécanismes d'inflammation en obésité	41
1.4 TRAITEMENTS DU CANCER	44
1.4.1 TRAITEMENTS CYTOTOXIQUES	44
1.4.2 IMMUNOGÉNÉICITÉ ET IMMUNOTHÉRAPIE	46
Lymphocytes et immunothérapie	47
Cellules myéloïdes et immunothérapie	49
1.5 SÉNESCENCE CELLULAIRE	51
1.5.1 IMMUNOSÉNESCENCE	53
SÉNESCENCE ET OBÉSITÉ	55
1.5.2 SÉNESCENCE, PATHOLOGIES ET CANCER	57
1.5.3 OPPORTUNITÉS THÉRAPEUTIQUES	61
Sénolyse ciblant les régulateurs du cycle cellulaire	61
Sénolyse ciblant les protéines de la famille BCL-2	62
Sénolyse ciblant la voie PI3K-AKT	64
Agents sénomorphiques	65
1.6 TLR4 DANS LE CANCER INDUIT PAR L'OBÉSITÉ	68
1.6.1 TLR4	68
1.6.2 TLR4 ET OBÉSITÉ	72
Obésité et ligands de TLR4	74
1.6.3 TLR4 ET CANCER	76
1.6.4 TLR4 ET SÉNESCENCE CELLULAIRE	80
<u>CHAPITRE 2 HYPOTHÈSES, OBJECTIFS ET APPROCHES EXPÉRIMENTALES</u>	81
2.1 PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	81

2.2 OBJECTIFS	82
2.3 APPROCHES EXPÉRIMENTALES	83
CHAPITRE 3	85
<hr/>	
ARTICLE1: OBESITY TRIGGERS TUMORAL SENESENCE AND RENDERS POORLY IMMUNOGENIC MALIGNANCIES AMENABLE TO SENOLYSIS	85
ABSTRACT	86
SIGNIFICANCE STATEMENT	86
INTRODUCTION	87
RESULTS	88
DIET-INDUCED OBESITY POTENTIATES TUMOR GROWTH AND TRIGGERS TUMORAL SENESENCE IN POORLY IMMUNOGENIC TUMORS	88
THERAPEUTIC SENOLYSIS WITH ABT-263 HINDERS OBESITY-DRIVEN TUMOR GROWTH UNIQUELY IN POORLY IMMUNOGENIC TUMORS	90
ABT-263 SELECTIVELY TARGETS SA-B-GAL ⁺ CANCER CELLS IN MICE WITH DIO AND STALLS TUMOR GROWTH	90
ABT-263 IMPEDES ACCUMULATION OF GROWTH-ARRESTED CANCER CELLS IN POORLY IMMUNOGENIC TUMORS WITH DIO	91
DISCUSSION	92
MATERIAL AND METHODS	94
AUTHOR CONTRIBUTIONS	99
ACKNOWLEDGMENTS	99
FOOTNOTES	100
FIGURES	101
SUPPLEMENTARY MATERIAL	108
SUPPLEMENTARY FIGURES	109
ARRIVE GUIDELINES FOR ANIMAL RESEARCH	115

Essential 10	115
SUPPLEMENTARY TABLES	120
REFERENCES	127
CHAPITRE 4	133
<hr/>	
ARTICLE 2 - TLR4 ELICITS PRO-TUMORAL SENESENCE VIA MYELOID-SPECIFIC IRE1α SIGNALING IN OBESITY	133
ABSTRACT	134
INTRODUCTION	135
RESULTS	137
TLR4 PARTICIPATES IN TUMORIGENESIS DURING HIGH BODY ADIPOSITY CONDITIONS	137
HOST EXPRESSION OF TLR4 DICTATES CANCER CELL SENESENCE IN THE TUMOR UNDER THE INFLUENCE OF A CHRONIC INFLAMMATORY MILIEU	138
TLR4 ELICIT IRE1 α -DRIVEN ER STRESS IN MYELOID CELLS ASSOCIATED TO THE TUMOR	140
MYELOID-SPECIFIC IRE1 α IMPACTS TUMORIGENESIS AND CELLULAR SENESENCE DURING DIO	141
DISCUSSION	141
METHODS	144
AUTHOR CONTRIBUTIONS	151
ACKNOWLEDGMENTS	151
FOOTNOTES	151
TABLES AND FIGURES	152
SUPPLEMENTARY MATERIAL	160
SUPPLEMENTARY FIGURES	161
SUPPLEMENTARY TABLES	164
REFERENCES	170
CHAPITRE 5 – DISCUSSION GÉNÉRALE	175
<hr/>	

5.1 CANCER ET SÉNOLYSE DURANT L'OBÉSITÉ	175
5.2 SIGNALISATION TLR4-IRE1 α DANS LA SÉNESCENCE CELLULAIRE DU MET	177
TLR4 accentue la croissance tumorale de cancer faiblement immunogène dans l'obésité	178
Un stress du réticulum endoplasmique médié par IRE1 α dans les cellules myéloïdes participe à la croissance et la sénescence tumorale via TLR4	179
5.3 PERSPECTIVES ET LIMITES DE L'ÉTUDE	183
Études humaines de thérapie sénolytique	183
Impact de l'immunogénicité sur la croissance tumorale induite par l'obésité	184
Étude complémentaire d'activation chronique de TLR4 dans un modèle infectieux	185
Identification et caractérisation des cellules immunitaires sénescents	186
Expression de TLR4 dans les cellules myéloïdes	187
Identification d'activateurs de TLR4 dans l'établissement d'un MET immunosuppresseur et pro-sénescence	187
<u>CHAPITRE 6 – CONCLUSION</u>	188
<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	191

Liste des tableaux

Tableau 1. – Article 1 - Supplementary Table S1. Clinical data of tumors analyzed in the study	
120	
Tableau 2. – Article 1 - Supplementary Table S2. Primary antibodies	121
Tableau 3. – Article 1 - Supplementary Table S2. Primer sequences.....	122
Tableau 4. – Article 1 - Supplementary Table S3. Key resources related to the Methods	123
Tableau 5. – Article 1 - Supplementary Table S4. Sample size justification for <i>in vivo</i> experiments	126
Tableau 6. – Article 2 - Table 1. Clinical data related to tumors analyzed in the study.....	152
Tableau 7. – Article 2 - Supplementary Table S1. Key resources related to the Methods	164
Tableau 8. – Article 2 - Table S2 – Primary antibodies.....	166
Tableau 9. – Article 2 - Supplementary Table S3. Primer sequences.....	168

Liste des figures

Figure 1. – Schéma illustrant le lien moléculaire entre l'obésité et le cancer.	44
Figure 2. – Schéma illustrant le concept d'immunogénicité tumorale au sens de la recherche. 47	
Figure 3. – Schéma illustrant les caractéristiques principales permettant l'identification des cellules sénescentes (Inspiré de la revue par González-Gualda et al. [379]).	53
Figure 4. – Schéma récapitulatif des stratégies thérapeutiques pour bloquer les effets délétères des cellules sénescentes.	67
Figure 5. – Représentation schématique de la signalisation de TLR4.	71
Figure 6. – Article 1 - Figure 1. Diet-induced obesity potentiates tumor growth and triggers tumoral senescence in poorly immunogenic tumors	101
Figure 7. – Article 1 - Figure 2. Therapeutic senolysis hinders obesity-driven tumor growth	103
Figure 8. – Article 1 - Figure 3. ABT-263 targets growth arrested SA- β gal ⁺ cancer cells in obese mice and limits tumor growth	106
Figure 9. – Article 1 - Figure 4. Senolysis impedes accumulation of growth-arrested cancer cells in poorly immunogenic tumors during DIO.	107
Figure 10. – Article 1 - Supplementary Figure S1. Related to Figure 1, diet-induced obesity potentiates tumour growth and triggers tumoral senescence in poorly immunogenic tumours ...	109
Figure 11. – Article 1 - Supplementary Figure S2. Related to Figure 2, therapeutic senolysis hinders obesity-driven tumour growth	111
Figure 12. – Article 1 - Supplementary Figure S3. senolysis targets SA- β gal ⁺ cancer cells in obese mice to limit tumour growth	112
Figure 13. – Article 1 - Supplementary Figure S4. Related to Figure 3, ABT-263 eliminates growth-arrested cancer cells in poorly immunogenic tumors during DIO.	114
Figure 14. – Article 2 - Figure 1. TLR4 participates of tumorigenesis during high body adiposity conditions	154

Figure 15. – Article 2 - Figure 2. Host expression of TLR4 dictates cancer cell senescence in the tumor under the influence of a chronic inflammatory milieu	155
Figure 16. – Article 2 - Figure 3. TLR4 elicit IRE1 α -driven ER stress in myeloid cells associated to the tumor	156
Figure 17. – Article 2 - Figure 4. Myeloid-specific IRE1 α impacts tumorigenesis and cellular senescence during DIO.....	158
Figure 18. – Article 2 - Supplementary Figure S1. Related to Figure 1, TLR4 participates in tumorigenesis during high body adiposity conditions.....	161
Figure 19. – Article 2 - Supplementary Figure S2. Related to Figure 2, Host expression of TLR4 dictates cancer cell senescence in the tumor under the influence of a chronic inflammatory milieu	162
Figure 20. – Article 2 - Supplementary Figure S3. Related to Figure 3, TLR4 elicit IRE1 α -driven ER stress in myeloid cells associated to the tumor	163
Figure 21. – Article 2 - Supplementary Figure S4. Related to Figure 4, Myeloid-specific IRE1 α impacts tumorigenesis and cellular senescence during DIO	163
Figure 22. – Résumé graphique du premier article de la thèse (Chapitre 3).	177
Figure 23. – Résumé graphique du deuxième article de la thèse (Chapitre 3).	182
Figure 24. – Représentation schématique des ligands et activateurs de TLR4 augmentés systématiquement en obésité.	188

Liste des sigles et abréviations

17-DMAG : 17-diméthylaminoéthylamino-17-déméthoxygeldanamycine

ABT-199 : Venetoclax

ABT-263 : Navitoclax

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADIPOR: Adiponectin receptor

ACAT1: Acétyl-CoA acétyltransférase 1

ALR: AIM2-like receptor

AMPc: Adenosine monophosphate cyclique

AMPK: AMP-activated protein kinase

AP-1: Activator protein 1

APN: Aminopeptidase N

ARN: Acide ribonucléique

ATF6: Activating transcription factor 6

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

ATP: Adenosine triphosphate

BAX: Bcl-2-associated X

BCL: B-cell lymphoma

Bft: Bacteroides fragilis toxin

BH3: BCL-2 homology region

BLS: Blasticidin-S acetyltransferase

C₁₂FDG: 5-Dodécanylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside

CAA: Cancer-associated adipocytes

CAF: Cancer-associated fibroblast

CAR T-cell: Chimeric antigen receptor T-cell

CCL: Chemokine ligand

CDK: Cyclin-dependent kinase

CDT: Cytotoxique distendant

CD: Cluster of differentiation
CG: Glycosides cardiaque
cGAS: Cyclic GMP-AMP Synthase
CLR: C-type lectin receptor
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
COX-2: Cyclo-oxygenase 2
CRC: Cancer colorectal
CREB: cAMP response element-binding protein
CSF1: Colony Stimulating Factor 1
CTLA: Anti-cytotoxique T-lymphocyte antigène
CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand
DAMP: Damage-associated molecular pattern
DDR: DNA-damage response
DIO : Obésité induite par la diète (Diet-induced obesity)
DNA-SCARS: DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence
D+Q: Dasatinib (D) + Quercétine (Q)
EGFR: Epidermal growth factor receptor
ER: estrogen receptor
ER stress: Endoplasmic reticulum stress
ERK: Extracellular signal-regulated kinase
ERN1: Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (Gène codant pour IRE1)
FadA: Fusobacterium nucleatum adhesion A
FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
FASN: Fatty acid synthase
FDA: Food and drug administration
FFA: Free fatty acid
FGF: Fibroblast growth factor
FOXO: Forkhead box protein O1
GCSF: Granulocyte colony-stimulating factor

GITR: Glucocorticoid-induced TNFR family related gene
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPER: G protein-coupled estrogen receptor 1
GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta
HCC: Hepatocellular carcinoma
HDL: High density lipoprotein
HGF: Hepatocyte growth factor
HIF: Hypoxia-induced factor
HLA-G: Human leukocyte antigen G
HMGB: High-mobility group box
HSL: hormone-sensitive lipase
HSP: Heat shock protein
HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell
ICB: Immune checkpoint blockade
ICOS: Inducible T-cell COStimulator
IFN: Interferon
IGF: Insulin growth factor
IGFBP: Insulin growth factor binding protein
IGFR: Insulin growth factor receptor
IgSF: Immunoglobulin superfamily
I κ B: Inhibitor of nuclear factor kappa B
I κ K: IkappaB kinase
IL: Interleukine
IMC : Indice de masse corporel
iNOS: inducible nitric oxyde synthase
INSR: Insulin receptor
IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRE1: Inositol-requiring enzyme 1
IRF: Interferon regulatory factor
IRS: Insulin receptor substrate

JNK: c-Jun N-terminal kinase
LAG3: Lymphocyte-activation gene 3
LBP: LPS binding protein
LDL: Low density lipoprotein
LEPR: Leptin receptor
LLC: Lewis lung carcinoma
LPS: Lipopolysaccharide
MAGL: Monoacylglycérol lipase
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK: Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1
MD-2: Myeloid differentiation 2
MDM2: Murine double minute 2
MDSC: Myeloid-derived suppressor cell
MEK: Mitogen-activated protein kinase
MET: Microenvironnement tumoral
MMP : Matrix metalloproteinase
mTOR: Mammalian target of rapamycin
mTORC: Mammalian target of rapamycin complex
MYC: Master Regulator of Cell Cycle Entry and Proliferative Metabolism
MYD-88: Myeloid differentiation primary response protein-88
NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Forme réduite)
NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease
NASH: Non-alcoholic SteatoHepatitis
NEMO: NF-kappa-B essential modulator
NF-κB: Nuclear factor-kappa B
NK (Cellule): Natural killer
NLR: NOD-like receptor

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain
NOTCH: Neurogenic locus notch homolog protein
OVT: Oncolytic virus therapy
oxLDL: oxidized low-density lipoprotein
PAI: Plasminogen activator inhibitor
PAMP: Pathogen associated molecular pattern
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PD-1: Programmed-death 1
PDGF: Platelet-derived growth factor
PD-L1: Programmed-death ligand 1
PERK: double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase
PGE2: Prostaglandin E2
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor
PRR: Pattern recognition receptor
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
ROS: Espèce reactive d'oxygène (Reactive oxygen species)
RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS: Rat sarcoma
RLR: RIG-like receptor
RIDD: Regulated IRE1-dependent decay
RIP: Receptor Interacting Protein
SA- β -gal: Senescence-associated beta galactosidase
SAHF: Senescence-associated heterochromatin foci
SASP: Senescence-associated secretory phenotype
SHBG: Sex hormone-binding globulin
STAT: Signal transducer and activator of transcription
TAB: TGF-Beta Activated Kinase
TAEC: Tumor-associated endothelial cells

TAK: TGF-Beta activated kinase kinase
TAM: Tumor-associated macrophages
TAN: Tumor-associated neutrophils
TGF: Tumor growth factor
TGI: Tractus gastro-intestinal
Th: T helper
TIGIT: T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM3: T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3
TIR: Toll-interleukin-1 receptor
TIS: Therapy-induced senescence
TLR: Toll-Like Receptor
TNF: Tumor necrosis factor
TNFR: Tumor necrosis factor receptor
TNFRSF: Tumor necrosis factor receptor superfamily
TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAF: Tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAM: TRIF-related adaptor molecule
T-reg: Cellule T régulatrice
TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
UPR: Unfolded protein response
VISTA: V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation
WNT: Wingless-related integration site
XBP1: X-Box Binding Protein 1
XBP1s: X-Box Binding Protein 1 spliced
XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Przemyslaw (Mike) Sapiha, pour son mentorat et sa confiance en moi pour l'élaboration, l'avancé et l'aboutissement de ce projet. Je tiens également à remercier les membres du jury évaluateur de cette thèse, Luis A. Rokeach, Mathieu Ferron et Ajitha Thanabalasuriar, ainsi que Vincent Poitout (représentant du doyen) et tous les membres du laboratoire Sapiha pour leurs précieuses contributions. Je veux particulièrement remercier Ariel Wilson pour ses corrections et ses commentaires tout au long de l'écriture de cette thèse. Je veux dire un grand merci à Sergio Crespo-Garcia, mon superviseur immédiat et grand ami, sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. En finissant, je veux remercier tout spécialement mon épouse, Jade Falardeau, sans qui je n'aurais pu passer au travers les 6 dernières années. En partageant les bons moments et en me supportant à travers les moins bons, elle m'a permis de me rendre jusqu'au bout de cette grande aventure. Cette thèse est autant la tienne que la mienne. Ton support et ton amour ont indéniablement été primordiaux à ma réussite. Merci à tous!

Chapitre 1 – Introduction

1.1 Introduction générale

« Cancer » est un mot d'origine latine signifiant crabe [1]. La représentation de ce crustacé est d'ailleurs utilisée en astrologie pour désigner les gens nés entre le 22 juin et le 22 juillet. Le mot cancer peut aussi vouloir dire ulcère rampant ou infiltrant [1]. Les médecins de la Grèce antique l'utilisait d'ailleurs pour désigner les masses ulcéreuses, observées durant les autopsies, ressemblant à des crabes avec leurs apparences irrégulières et leurs prolongements vasculaires «ancrant» la masse dans le tissu affecté au même titre qu'un crabe le ferait avec une proie [2].

Le cancer, bien que connu depuis l'Égypte antique (3150-30 av. J.-C) et documenté depuis l'ère d'Hippocrate (460-370 av. J.-C) [2], est une maladie multifactorielle encore mal comprise, mal traitée et pourtant tant étudiée. Ce n'est qu'à partir du début des années 1950 que l'on établit le lien entre le cancer et le vieillissement [3]. Des conclusions similaires, appuyées par un modèle mathématique, avaient été obtenues par Armitage et Doll [4] qui, quelques années plus tard, révisèrent leur modèle en proposant plutôt un développement en seulement deux étapes [5]. Ce modèle a ensuite été repris par Knudson en 1971. En se basant sur 48 rapports de cas de rétinoblastomes, un cancer de la rétine, il propose le maintenant célèbre *two-hit model* [6]. Selon lui, deux coups ou «*hit*» doivent impacter l'ADN pour initier un cancer. La première atteinte au matériel génétique peut aussi être héritée via les cellules germinales, ce qui accélère l'évolution de la maladie [6]. En somme, nous nous sommes longtemps attardés sur le lien génétique entre le vieillissement cellulaire et le cancer. À cet égard, on pensait que l'action des cellules cancéreuses pouvait, à elles seules, soutenir le développement tumoral. Récemment, une version revisitée de la célèbre revue *Hallmarks of cancer* [7], parue pour la première fois en 2000 dans *Cell* [8], fait maintenant état de 14 caractéristiques biologiques acquises (*hallmarks*) lors du développement d'une tumeur (signalisation proliférative soutenue, évasion des suppresseurs de tumeurs, résistance à l'apoptose, immortalité répllicative, induction de l'angiogénèse, évasion et formation de métastases, reprogrammation du métabolisme énergétique, évasion du système immunitaire, instabilité génomique, promotion de l'inflammation par la tumeur, **plasticité phénotypique**, **reprogrammation épigénétique**, **microbiomes polymorphiques** et **sénescence cellulaire**), soit 4 de plus que sa version de 2011 (nouvelles caractéristiques en gras) [9]. Depuis la première

mouture de cette revue, on met en lumière, non seulement l'importance des mutations dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, comme il avait été mis de l'avant depuis si longtemps, mais aussi sur l'établissement d'un microenvironnement tumoral (MET) composé de cellules saines (non-tumorales) influencées de façon systémique. Dans cette thèse, un accent a été mis sur la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires permettant à une tumeur d'échapper au système immunitaire. Plus spécifiquement, nous investiguons l'apport de la sénescence cellulaire, un des 4 nouveaux *hallmark* du cancer (défini par un programme moléculaire causant l'arrêt du cycle cellulaire suite à un stress endogène ou exogène insurmontable [Voir **section 1.5 Sénescence cellulaire**]) sur la croissance tumorale [7]. Présents en grande quantité dans les conditions de stress chronique et d'accélération du vieillissement cellulaire comme dans l'obésité, les cellules sénescents permettraient aussi d'échapper aux thérapies et de permettre la récurrence du cancer [10]. Nous souhaitons donc mieux comprendre comment l'obésité impacte les cellules de l'hôte d'une manière à permettre une croissance accélérée de tumeurs malignes avec une attention particulière sur la sénescence cellulaire.

1.2 L'Obésité comme facteur de risque du cancer

En 2021, il est estimé que, quotidiennement, 628 personnes reçoivent un diagnostic de cancer et 232 personnes décèdent du cancer en moyenne au Canada. Toujours en 2021, le cancer représentait environ le tiers de tous les décès au Canada. Les données les plus récentes nous permettent d'estimer que 2 canadiens sur 5 développeront une forme de cancer à un point de leur vie et que 1 canadien sur 4 décèdera de cette maladie [11]. Plusieurs facteurs de risque peuvent augmenter sa prévalence. L'âge et le fait d'être porteur de mutations génétiques dans des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs en font notamment partie [12]. Plusieurs autres facteurs de risque environnementaux et modifiables comme fumer, être en contact avec des rayons ultraviolets, certains types d'infections ou l'obésité peuvent aussi participer au développement de la maladie [12].

L'obésité, typiquement représentée comme le résultat d'un déséquilibre entre l'apport calorique ingéré et la dépense énergétique, est associée à une augmentation de la masse de tissus adipeux et des changements métaboliques importants [13, 14]. Ces changements, aussi présentés comme le «syndrome métabolique», se caractérisent par une adiposité abdominale élevée, une réduction des taux de cholestérol HDL, une augmentation des taux de triglycérides,

une hypertension et une résistance à l'insuline [15]. Il n'est donc pas surprenant que le lien entre l'obésité, les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2 soit communément accepté. Néanmoins, il est maintenant de plus en plus évident que l'obésité est aussi associée au développement de plusieurs cancers [16-20]. En effet, mondialement, l'obésité serait actuellement responsable d'environ 12% des cancers chez l'homme et 13% chez la femme [21]. Aux États-Unis, 20% de tous les décès liés au cancer chez la femme et 14% chez l'homme de 50 ans et plus serait attribuable à de l'embonpoint [22]. À l'exception du mélanome et des cancers du poumon et du rein, un indice de masse corporel (IMC) plus grand que 30 diminuerait le taux de survie global (*overall survival*) et la survie spécifique au cancer (*cancer-specific survival*) et augmenterait les risques de récurrence de la maladie [23]. On peut penser que, pour les exceptions susmentionnées, leur forte association à des facteurs de risque qui leur sont propre, comme les rayons ultra-violet et les mélanomes ou fumer et le cancer du poumon, diminue l'impact de l'obésité comme facteur de risque [24]. Dans l'exemple du cancer du poumon, on observe même une perte de poids associée à la consommation de cigarette, ce qui peut expliquer une corrélation négative entre l'IMC et certains type de cancer [25]. Dans ces cas, l'effet du surpoids n'est donc pas nécessairement protecteur. Néanmoins, plusieurs études ont suggéré qu'il existe un «paradoxe de l'obésité» et que des patients cancéreux avec un IMC considéré normal (entre 20 et 25) peuvent aussi bien avoir des pronostics moins favorables que les patients obèses [25-27]. Toutefois, ce phénomène est mal compris et reste actuellement controversé. En général, la caractérisation de l'obésité avec des indices contraignants (ex. IMC) et l'effet d'autres facteurs de risque sur la prise ou la perte de poids sont des indications qui tendent à expliquer ce paradoxe. Ceci dit, en considérant la forte tendance des pays industrialisés, comme le Canada et les États-Unis, vers un mode de vie sédentaire et une diète riche en gras et en produits transformés, ces statistiques risquent d'augmenter drastiquement [13]. Il est même prédit que 86% de la population américaine sera en surplus de poids d'ici 2030 [28].

Les études investiguant le rôle de l'obésité dans le développement du cancer visent aussi à comprendre comment certaines interventions contre la prise de poids peuvent impacter le développement du cancer. Parmi ces interventions, la chirurgie bariatrique est souvent utilisée et entraîne une perte de poids, l'atténuation de l'inflammation du tissu adipeux et l'augmentation de la sensibilité à l'insuline [29-31]. Pourtant, des études montrent que les cancers chez la femme sont beaucoup plus affectés par la chirurgie bariatrique que les cas de cancer chez les hommes [32, 33].

En contrepartie, une diète faible en calories peut entraîner une diminution de l'expression des gènes pro-inflammatoires et augmenter l'expression des gènes anti-inflammatoires dans le tissu adipeux viscéral de femmes obèses pré-ménopausées [34] et diminuer l'expression de biomarqueurs associés au cancer du sein (SHBG, estradiol, insuline, protéine C-réactive, adiponectine et leptine) chez des femmes obèses ménopausées [35]. De même, une vaste étude sur une population de poids mixtes a révélé que la perte de poids, toutes causes confondues, était associée à un risque réduit de cancer du côlon [36]. De plus, la restriction calorique est maintenant considérée comme une intervention efficace pour limiter et retarder le développement du cancer [37]. Dans une autre étude, un groupe a montré que les effets de la diète sont beaucoup plus importants que les effets de l'exercice sur la diminution de l'expression de facteurs inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF α dans le plasma et le tissu adipeux [38]. De façon intéressante, il a été montré que parmi les groupes de patients ayant un apport calorique similaire, ceux qui perdent le moins de poids ou qui reprennent ce poids plus facilement présentent plus d'inflammation adipeuse, d'IL-6 dans le sang et une résistance à l'insuline plus importantes [39]. Ainsi, il semble exister une association étroite entre l'inflammation et la prise de poids et une diète hautement calorique semble jouer un rôle majeur dans ce processus. Pourtant, malgré d'importants efforts de recherche, les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels la croissance tumorale induite par l'obésité est déclenchée et progresse restent mal compris.

1.3 Lien moléculaire entre cancer et obésité

Plusieurs conséquences directes de l'obésité font partie des éléments principaux qui participent à la carcinogénèse (**Figure 1**). Comme il sera présenté, ces éléments peuvent affecter autant l'initiation, la promotion et la progression tumorale.

1.3.1 Biodisponibilité des lipides

L'augmentation drastique de la biodisponibilité en lipides peut jouer un rôle majeur sur la croissance tumorale. Le déséquilibre menant à l'accumulation du gras en circulation peut se faire à plusieurs niveaux. Une expansion adipeuse excessive entraîne des réponses pro-inflammatoires qui stimulent la lipolyse et la sécrétion d'acides gras libres (*free fatty-acids* ou FFAs) [40]. Au premier niveau, ces niveaux élevés de FFAs circulants ont des effets lipotoxiques directs via la production d'espèces réactives d'oxygène (*reactive-oxygen species* ou ROS) [41]. L'excès de

lipides se dépose aussi dans les tissus et les organes et peut entraîner des effets indésirables sur les muscles, le cœur, le foie ou les cellules β pancréatiques [42]. Un bon exemple de ce phénomène est celui du développement du cancer du foie. Le dépôt des FFAs dans le foie peut entraîner une stéatose hépatique (accumulation anormale de triglycérides dans les cellules hépatiques) non alcoolique (*non-alcoholic fatty liver disease* ou NAFLD), une stéato-hépatite non alcoolique (*non-alcoholic steatohepatitis* ou NASH) et une cirrhose (dysfonction hépatique causée par l'accumulation de tissus cicatriciels dans le foie) et ultimement le développement de carcinome (cancer issu de cellules épithéliales) hépatocellulaire (*hepatocellular carcinoma* ou HCC) [43-45]. Il a également été rapporté que la dérégulation du stockage et du métabolisme des lipides associée à l'obésité a un impact sur le risque de cancer dans les tissus qui ne jouent pas un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie métabolique, notamment les tissus mammaires, prostatiques et colorectaux [46-48]. L'augmentation du cholestérol associée à la dyslipidémie, soit une augmentation anormalement élevée de lipides dans la circulation sanguine, peut contribuer à la croissance et les métastases du cancer du sein [47] et réguler l'inflammation hépatique liée à la progression de la NAFLD vers la NASH [49].

De plus, la dérégulation des voies de signalisation dans le métabolisme des lipides peut aussi jouer un rôle dans la croissance tumorale. Il existe une théorie selon laquelle les lipides circulants, qui se voient augmentés en obésité, puissent participer à la production de nouvelles structures membranaires [40]. De la même manière, les intermédiaires carbonés peuvent être réutilisés pour la génération d'acides nucléiques et d'acides aminés pour la réplication cellulaire. Dans certains cancers, il semble que l'hyperactivation d'un certain nombre de voies de synthèse des lipides appuie ce concept. Par exemple, la régulation à la hausse de la l'acide gras synthase (FAS), enzyme codée chez l'humain par le gène FASN, est corrélée à un mauvais pronostic pour le cancer de la prostate chez l'homme [50].

Par ailleurs, il a été montré que les cellules cancéreuses peuvent également reprogrammer les adipocytes adjacents au microenvironnement tumoral pour qu'ils adoptent un phénotype communément de *cancer associated adipocytes* ou CAA [51]. Ces adipocytes sont caractérisés par une diminution de leur taux de lipides. Les CAA perdent plusieurs marqueurs de caractérisation des adipocytes comme HSL, APN, résistine, aP2, C/EBP et leptine et ils adoptent un caractère plus inflammatoire en exprimant de fortes concentrations de métalloprotéinases matricielles (MMP)-11/stromélysine-3, ainsi que d'IL-6 et d'IL-1 β [51]. De façon intéressante, il semble que les

cytokines sécrétées par les cellules cancéreuses engagent les adipocytes dans une reprogrammation en CAA. En conséquence, ceux-ci libèrent des FFA hautement énergétiques qui participent aux mécanismes susmentionnés [52]. L'hyperplasie, soit l'augmentation du nombre, et l'hypertrophie, soit l'augmentation de la taille, des adipocytes du tissu adipeux entraînent aussi la prolifération de progéniteurs adipocytaires dans la fraction stroma-vasculaire [53]. Ce phénomène est connu pour mener à l'augmentation de l'angiogenèse pour oxygéner un tissu hypoxique [54]. De façon intéressante, les premières étapes du développement du cancer comportent des similitudes frappantes avec l'expansion adipeuse.

1.3.2 Signalisation de l'insuline

En surplus de poids, une altération métabolique, affectant cette fois-ci le glucose, engendre des changements systémiques majeurs pouvant influencer le développement du cancer en obésité. La démonstration de la dépendance des cellules cancéreuses pour le glucose et la glycolyse n'est plus à faire [8]. Dès les années 1920, Otto Warburg rapportait déjà cette observation pionnière [55, 56]. Il a d'ailleurs été montré que l'exposition chronique de cellules cancéreuses primaires à des conditions hyperglycémiques *in vivo* ou *in vitro* peut induire des modifications épigénétiques protumorales qui accélère leur pouvoir prolifératif [57]. Ce programme persisterait même après un retour à des conditions normo-glycémiques.

En obésité, la résistance à l'insuline conduit à l'hyperglycémie et au diabète de type 2, ce qui profite grandement à ces cellules [58]. D'ailleurs, des niveaux élevés de glucose sanguins seraient corrélés à une augmentation de l'incidence du cancer [59]. Cette incidence mènerait même à des taux de mortalité associés à la maladie deux fois plus grands chez les patients diabétiques en comparaison avec des patients non diabétiques [60, 61]. Les données épidémiologiques établissent d'ailleurs un lien entre le diabète de type 2 et une incidence accrue de plusieurs types de cancer, tels les cancers du sein [62], colorectaux [63], hépatiques [64], endométriaux [64] et pancréatiques [65-67].

Lorsque l'on parle de résistance à l'insuline, on imagine que l'ensemble des tissus et organes sont résistants de la même manière. Pourtant, dans le foie diabétique par exemple, la voie gluconéogénique devient insulino-résistante, mais la lipogenèse stimulée par l'insuline reste sensible [68]. On peut donc s'imaginer que la grande sécrétion de l'insuline, qui accompagne le syndrome métabolique et le diabète, engendre une suractivation des voies de signalisation insulino-

dépendantes dans plusieurs tissus. Les facteurs de croissance analogues à l'insuline IGF1 et IGF2, des hormones principalement produites dans le foie [69], seraient fortement exprimés chez les patients obèses atteints de diabète de type 2 [70] ainsi que chez les rongeurs soumis à un modèle d'obésité [71]. Ces protéines se lient au récepteur IGF1R, qui peut se dimériser avec le récepteur à l'insuline (INSR). De façon similaire à ce qui est documenté pour le diabète de type 2, l'expression de l'IGF1R et de l'INSR est étroitement associée à plusieurs types différents de tumeurs solides tels les tumeurs mammaires [72], de l'endomètre [73], de l'estomac [74] et du colon [75]. De plus, en laboratoire, des explants de cellules cancéreuses du sein génétiquement déficientes en IRS2 perdent la capacité à former des métastases [76]. Comme susmentionné, les voies suractivées de signalisation de l'insuline sont étroitement liées à la progression tumorale. L'activation des récepteurs de cette voie entraîne la phosphorylation de IRS, et l'activation des voies oncogéniques RAS/MAPK et PI3K/AKT [77, 78]. De plus, la voie AKT active mTOR, qui favorise la traduction des protéines et la croissance des cellules cancéreuses [79]. Également, il est à noter que plusieurs études ont aussi montré l'impact de la délétion d'IGF1 ou d'IGF1R, notamment dans des modèles murins de cancer de la prostate [80], de mélanome [81], de carcinome pancréatique [82] et cancer du sein [83], et de la délétion d'IGF2 dans un modèle de cancer du poumon [84] et du sein [85]. Cependant, certaines études ont aussi montré que l'obésité diminue les niveaux d'hormone de croissance qui contrôle la sécrétion d'IGF1 [86]. En contrepartie, des niveaux élevés d'insuline affectent les niveaux d'expression de protéines de liaison à l'IGF (IGFBP), soit les protéines, qui ont pour rôle de séquestrer les IGF [87]. Ainsi, il semblerait que l'obésité ait une association complexe avec les taux d'IGF systémiques. Des niveaux réduits d'IGFBP1 sont d'ailleurs associés à un risque accru de cancer colorectal [88, 89]. Aussi, il est connu depuis longtemps que l'insuline favorise la synthèse de l'ADN dans les lignées cellulaires humaines de cancer du sein [90], suggérant un effet mitogène de cette hormone.

En terminant, l'activation chronique du métabolisme du glucose au sein de mitochondrie peut aussi entraîner la génération de ROS, augmenter la conversion du glucose en sorbitol, diminuer les niveaux de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) et de glutathion [91, 92]. En somme, l'accumulation de ROS combiné à la réduction de la capacité antioxydante au sein d'une même cellule promouvoit fortement l'initiation néoplasique (initiation d'une nouvelle masse tumorale) [93]. Pour finir, dans une étude humaine, il a été montré que le stress oxydatif causé par l'hyperglycémie augmente les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires comme

l'IL-6 et le TNF α [94]. Comme il sera revu plus bas, l'inflammation joue un rôle central sur le développement de tumeurs mis encore une fois en évidence ici (Voir **section 1.3.5 Inflammation**).

1.3.3 Dysbiose

Dès l'Égypte Antique, les médecins exploitaient déjà le lien entre les pathogènes et le cancer [95]. Les récits historiques font état d'un traitement contre les «gonflements», que l'on pense être des tumeurs visibles, avec des incisions recouvertes de cataplasme causant une infection. Beaucoup plus tard (13^e siècle), Peregrine Laziosi décrivait la régression spontanée de sa tumeur ulcérée à la jambe avant d'avoir recours à l'amputation [96]. Après un autre bond dans le temps, soit à la fin des années 1800, Wilhelm Busch et Friedrich Fehleisen ont indépendamment rapporté des régressions tumorales spontanées chez des patients infectés par *Streptococcus pyogenes* [97, 98]. Dans la même période, William Coley a ensuite commencé à tester une sorte de «vaccin oncolytique», c'est-à-dire une injection pour éliminer les cellules cancéreuses, en se servant de souches vivantes ou tuées par la chaleur de *Streptococcus* et *Serratia* sur des patients cancéreux en phase terminale [99, 100]. Sa méthode controversée, et menant souvent à la mort, aura aussi augmenté le taux de survie de ses patients dans 30% des cas. Cette stratégie est aujourd'hui considérée comme la première démonstration intentionnelle d'immunothérapie. Au début de l'année 2022, la revue scientifique reconnue de Hanahan *Hallmarks of cancer*, paru pour la première fois en 2000 et revisitée à chaque décennie, ajoutait officiellement les «microbiomes polymorphiques» à la liste des caractéristiques protumorales acquises [7]. Cet ajout illustre bien l'importance des microbes sur la tumorigénèse et l'attention maintenant accordée aux microbiomes dans la recherche en cancérologie.

La dysbiose se traduit par un déséquilibre du microbiome intestinal [101]. Cette population microbienne de notre tractus gastro-intestinal provient de différentes origines. Des preuves récentes suggèrent que, in utero, les bactéries du placenta, du liquide amniotique et du cordon ombilical contribuent à notre microbiome intestinal [102, 103]. À la naissance, la microflore supplémentaire qui s'installe dans notre intestin provient du microbiote vaginal de la mère, mais aussi de l'environnement extérieur et est donc fortement influencée par ce que nous ingérons [104]. Selon le même groupe, la diversité microbienne recensée (intestinal et autres sources) compte 55 grandes divisions bactériennes ainsi que 13 divisions d'Archéobactéries. Néanmoins, les populations microbiennes de l'intestin (microbiote intestinal) sont plus ou moins exclusives à 2 ou

3 grands phylums, à savoir les Bacteroidetes (Gram-négatif), les Firmicutes (gram-positif) et aussi les Actinobactéries (gram-positif) [28, 105]. Par définition, le microbiote intestinal représente l'ensemble des micro-organismes mutualistes, commensaux et pathogènes, appartenant majoritairement aux deux ou trois grands groupes cités ci-dessus, tapissant les parois du tractus gastro-intestinal (TGI). Bien que le terme microbiote ne soit pas exclusif au TGI (par exemple cutané, vaginal, oral, etc.), 99 % de notre masse microbienne réside dans le TGI [106]. Il y a environ $3,8 \times 10^{13}$ bactéries dans notre intestin, ce qui représente un ratio se rapprochant du 1:1 entre le nombre de bactéries et de cellules de l'hôte selon les dernières estimations [107]. De plus, le microbiote intestinal, soit l'ensemble des bactéries et Archéobactéries contenues dans l'intestin, contient plus de 100 fois la quantité de contenu génomique du génome humain [106]. Considérant que cette microflore intestinale et l'hôte ont co-évolué pour devenir une entité complexe, cette relation étroite comporte des risques pour l'une ou l'autre entité quant à la sélection préférentielle des phylums bactériens et, d'autre part, au développement de maladies; surtout lorsqu'il existe une perturbation de l'homéostasie intestinale [27]. C'est pourquoi le microbiote intestinal est désormais considéré comme un organe à part entière pouvant avoir un réel impact sur l'organisme hôte. En effet, elle semble être liée à des fonctions essentielles à la santé humaine, telles que la bonne absorption des nutriments et l'activation du système immunitaire inné [108]. De plus, il a été démontré qu'il est également étroitement lié à l'intégrité de la barrière intestinale [109]. Il est maintenant admis que la dysbiose joue un rôle majeur dans de nombreuses pathologies allant du syndrome métabolique [109] aux maladies oculaires [110] en passant par le cancer [111].

Sur les 10^{12} espèces microbiennes estimées sur Terre [112], seulement 11 espèces sont classées comme carcinogènes selon l'Association internationale des registres du cancer (IACR) [113]. À eux seuls, ces 11 espèces sont responsables d'environ 2,2 millions de diagnostics par an (~13% des cas de cancer dans le monde). La plus grande présomption du lien entre une prévalence microbienne particulière et le cancer est probablement celle de *H. Pylori* et des carcinomes gastriques [114]. Pour cette raison, *H. Pylori* est même considéré comme un carcinogène de type 1 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [115]. Par contre, d'autres espèces peuvent initier plusieurs types de cancer par la production d'agents génotoxiques tel que la colibactine [116, 117], la toxine CDT [118] et la toxine de *Bacteroides fragilis* (Bft) [119]. Plusieurs microbes peuvent aussi amplifier la tumorigénèse par leur action sur la signalisation cellulaire. Notamment, *Fusobacterium nucleatum* (FadA) et plusieurs souches de Salmonelle (AvrA) induisent la

signalisation E-cadhérine-Wnt- β -caténine et influence la programmation cellulaire pour favoriser l'initiation tumorale [120, 121]. De plus, une catégorie supplémentaire de bactéries «complices» pourrait favoriser le développement tumoral sans toutefois initier le cancer [122-125]. Cette catégorie de pathogènes semble impacter les fonctions immunitaires pour faciliter la progression tumorale. Par exemple, les mutations courantes de p53 dans l'intestin ne sont pas suffisantes pour induire la carcinogénèse et nécessite la présence d'acide gallique microbien [126].

L'obésité est l'une des conditions les plus connues et les plus étudiées comme menant à la dysbiose [127-129]. De façon intéressante, des expériences avec des souris sans germes ont montré que la présence de ces germes dans l'intestin est associée à une augmentation notable du poids corporel et de la masse adipeuse [130]. D'ailleurs, le transfert de microbiote d'une souris avec germe vers une souris sans germe entraîne une augmentation de 57 % de la graisse corporelle en seulement deux semaines. De plus, il a été rapporté que les souris sans germes sont résistantes à l'adiposité induite par l'alimentation, un phénotype qui peut être renversé par le transfert de microbiote [131]. En surplus de poids, les phylums principaux se voient débalancés en faveur des *Firmicutes* autant chez l'homme que chez la souris [132]. Des modèles ont été mis de l'avant (*driver-passenger model* et modèle triangulaire de Zitvogel *et al.*) pour conceptualiser l'effet d'une dysbiose induite par l'obésité sur la carcinogénèse [133, 134]. L'idée générale est qu'il existe une relation entre les microbiotes, le système immunitaire et le cancer. Un environnement favorisant la croissance d'une espèce bactérienne pathologique déséquilibre la relation immunité-cancer et favorise la carcinogénèse. L'environnement dysbiotique créé en période d'obésité augmente la perméabilité intestinale et, conséquemment, augmente la présence de ligands microbiens et provenant de la diète [109, 135]. On se retrouve alors dans une situation de bactéries «complices» qui impactent la réponse immunitaire de façon à générer une réponse protumorale. Le rôle des ligands retrouvés systémiquement dans l'obésité sera revu plus bas.

1.3.4 Adipokines, hormones et principales protéines surexprimées dans l'obésité

Les changements métaboliques peuvent affecter l'expression systémique d'adipokines, d'hormones et de protéines clefs qui auront un impact sur le microenvironnement tumoral. Voici une présentation des molécules principalement impliquées dans ces processus.

Adiponectine

L'adiponectine est l'adipokine la plus fortement sécrétée par les tissus adipeux [136]. Bien qu'elle semble avoir une activité antitumorale, ses niveaux circulants sont inversement proportionnels avec la prise de poids, ce qui limite ses effets anti-inflammatoires [40]. En fait, plusieurs études tendent à montrer un effet protecteur de l'adiponectine contre le développement du cancer. Par exemple, la faible expression de l'adiponectine, tout comme les mutations dans les récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 sont associés à un mauvais pronostic de plusieurs cancers [137-142] suggérant un rôle important de l'adiponectine dans les cancers associés à l'obésité. Au niveau mécanistique, il a été montré que l'haploinsuffisance d'adiponectine régulerait négativement PTEN via une signalisation PI3K-AKT sur-régulée dans un modèle de cancer du sein [143]. Cette adipokine peut aussi activer l'AMPK en réponse à l'état des nutriments [144] et les cellules de carcinome hépatocellulaire montrent une augmentation de la phosphorylation de JNK et une diminution de la phosphorylation de mTOR en réponse à l'adiponectine [145]. Au niveau cellulaire, il semble que les souris déficientes en adiponectine montrent une croissance tumorale accrue dû à une forte infiltration de macrophages [146]. En terminant, différents modèles de croissance tumorale ont montré que l'adiponectine et la leptine semblent avoir des rôles opposés dans le développement du cancer [145, 147, 148], un phénomène aussi observé quant à leurs fonctions sur les maladies métaboliques [149].

Leptine

La leptine, aussi connue sous le nom de l'hormone de satiété, est l'hormone médiatrice d'une boucle de rétroaction qui régule l'appétit et contrôle l'homéostasie énergétique en agissant par l'intermédiaire de son récepteur (LEPR), notamment dans le noyau arqué de l'hypothalamus [150], mais aussi sur d'autres régions du cerveau [151]. La désensibilisation du récepteur LEPR dans le cerveau est associée à la suralimentation et à la prise de poids [152] et plusieurs études ont documenté son effet dans le développement de certains cancers comme les cancers du côlon [153] et du sein [154]. Des études épidémiologiques [155, 156], mais pas toutes [157, 158], ont montré une association entre les niveaux de leptine et le cancer.

La leptine signale principalement via les voies des MAPK et JNK/STAT [159-161]. Par contre, il a été démontré que la leptine peut aussi avoir une action protumorale via son action stimulatrice de l'activité de l'aromatase et du récepteur α des œstrogènes dans les cellules de cancer

du sein via la stimulation de la voie ERK1/ERK2 [162]. De façon intéressante, ces voies convergent pour agir sur la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α . La leptine peut aussi favoriser la vascularisation tumorale en stimulant l'expression de VEGF et de FGF-2 [163] ainsi que du facteur HIF-1 α [164]. De plus, on a documenté un impact de la leptine sur la production de MMP-2, MMP-9 et VEGF-a, via son action sur le récepteur du VEGF et l'expression de NOTCH [165], sur la transition épithéliale-mésenchymale et le renouvellement de cellules souche [166, 167]. En terminant, il a été rapporté que l'expression de la leptine peut s'accompagner de la production de ROS et la sécrétion de leucotriène B4, de cyclooxygénase 2 (COX2) et de monoxyde d'azote [168]. En contrepartie, son expression chronique peut aussi impacter la sécrétion de facteur de polarisation des cellules Th2 (ex. IL-4, IL-10) [169, 170]. Cette fonction de la leptine doit contribuer à l'établissement d'un MET immunosuppresseur.

Resistin et Visfatine

Mis à part l'adiponectine et la leptine, d'autres adipokines comme la resistin et la visfatine sont aussi élevées dans l'obésité et joueraient des rôles dans le développement et la progression de plusieurs cancers via, notamment, l'initiation de l'inflammation [171-173]. Par exemple, dans un modèle animal de cancer du sein, on a documenté un rôle de la resistin sur la transition épithélio-mésenchymateuse et la transition du caractère souche des cellules cancéreuses. Ces effets seraient médiés via une signalisation TLR4/NF- κ B/STAT3 [173]. L'importance de la resistin est aussi mise en évidence chez des patients obèses soumis à une diète cétogénique pour diminuer l'apport calorique [174-176]. Dans ces cas, on observe une normalisation des taux systémiques de resistin, en plus du rétablissement du ratio adiponectine/leptine, ce qui réduit les symptômes du syndrome métabolique.

Œstrogène

La signalisation de l'œstrogène a été investiguée à plusieurs niveaux pour son rôle dans la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et, incidemment, le développement tumoral. Depuis longtemps, on sait que l'élimination de la production d'œstrogène, via notamment la résection des ovaires chez les femmes pré-ménopausées, a un effet important au niveau clinique sur le développement de cancers hormono-dépendants [177].

Au niveau mécanistique, l'œstrogène agit via son récepteur (ER) et via la stimulation de la voie de signalisation IGF1 dans le cancer du sein [178], et via la liaison des œstrogènes au récepteur des œstrogènes couplé aux protéines G (GPER) dans le cancer de l'endomètre et du sein [179, 180]. Suivant l'activation du GPER, les cellules induisent des programmes d'angiogénèse via le facteur HIF1 α [181]. Même après la ménopause, l'œstrogène peut être produit via la conversion périphérique des androgènes par l'enzyme aromatase. L'un des mécanismes liés à l'obésité les mieux caractérisés pour la pathogénèse du cancer implique l'activité accrue de l'aromatase, via son gène CYP19A1, dans le tissu adipeux et plus spécifiquement le tissu adipeux mammaire et les cellules stromales adipeuses [182-184]. Ainsi, l'obésité et le syndrome métabolique sont des facteurs de risque clefs associés à une inflammation accrue œstrogène-dépendante.

Des études *in vitro* sur des préadipocytes mammaires humains primaires ou des cellules stromales adipeuses ont contribué à définir les mécanismes par lesquels l'aromatase joue un rôle pathologique en obésité. Il a notamment été démontré que la prostaglandine E2 (PGE2) stimule fortement l'expression de CYP19A1 via l'activation de PII, le promoteur contribuant à la majorité des transcrits d'aromatase dans le tissu mammaire [185-187]. Cette stimulation engendre l'activité de plusieurs facteurs de transcription et co-régulateurs (ex. CREB, AMPc, MAPK, JNK, HIF1 α , LRH-1, etc.) [188-194]. L'activité de p53, en plus d'être impliqué dans la régulation du cycle cellulaire [195], peut aussi influencer la répression transcriptionnelle du gène CYP19A1, mais PGE2 et la leptine agissent comme inhibiteurs de ce processus [196, 197]. Pour terminer, des cytokines inflammatoires comme l'IL6 ou le TNF- α peuvent aussi stimuler l'expression du promoteur CYP19A1 I.4 et boucler la boucle de régulation [198, 199].

Endotrophine, Ostéopontine et YKL-40

L'endotrophine, un produit de clivage du collagène VI, est fortement exprimé dans le tissu adipeux de souris obèses en s'accumulant spécifiquement dans les structures en couronnes (*crown-like structure*) du tissu adipeux, soit les structures composées de macrophages en périphérie d'adipocytes mourants [200]. L'endotrophine stimule la croissance des cellules tumorales ainsi que l'évasion métastatique via la signalisation du TGF- β , ce qui en fait un ligand important dans le développement tumoral associé à l'obésité [200]. D'autres protéines comme l'Ostéopontine ou le YKL-40 sont aussi des molécules fortement exprimées dans l'obésité pour lesquelles on a rapporté des rôles dans la transformation et la progression néoplasique ainsi que les processus menant aux

métastases [201, 202]. Comme beaucoup d'autres facteurs permettant l'évasion du système immunitaire de la masse nouvellement formée, les voies menant à l'établissement d'une réponse immunosuppressives comme STAT3 et AP-1 seraient activées suite à leur signalisation.

1.3.5 Inflammation

Déjà, en 1863, soit il y a presque 160 ans, Rudolf Virchow documentait un lien entre l'inflammation et le cancer en montrant l'infiltration de leucocytes dans les néoplasmes [203]. Il suggérait alors que «l'infiltrat lympho-réticulaire» révélait que l'origine d'une tumeur se trouvait au site d'une inflammation chronique. Les sections précédentes ont certainement mis en évidence l'importance de cette dite inflammation chronique sur le développement du cancer dans l'obésité. Depuis, nous comprenons maintenant beaucoup mieux les dynamiques entourant l'initiation d'une réponse immunitaire et l'établissement d'une réponse adaptative chronique et durable. L'impact de l'inflammation systémique en lien avec une adiposité élevée dans la promotion du cancer est fortement défendu [21, 40, 204-207]. Paradoxalement, un niveau systémique élevé de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'Il-1 β , l'Il-6 ou PAI-1 peut avoir un effet protumoral [208-210], mais aussi antitumoral [211-213]. Ces cytokines pro-inflammatoires sont d'ailleurs particulièrement décrites comme participant au développement du cancer en l'obésité.

Cytokines pro-inflammatoires principales

Comme son nom l'indique, le *tumor necrosis factor* ou TNF α a originalement été identifié pour son rôle dans l'induction de la nécrose des cellules tumorales par les endotoxines [212]. Les niveaux systémiques de TNF α augmentent, autant chez les rongeurs en surplus de poids [214] que chez les humains obèses [215]. Aujourd'hui, TNF α est pourtant utilisé comme biomarqueurs impliqué dans le développement de nombreux cancers via, notamment, la promotion de l'angiogénèse et de l'évasion métastatique des cellules cancéreuses [216, 217]. En effet, plusieurs groupes ont montré que TNF α est nécessaire pour le développement tumoral dans plusieurs modèles de souris [209, 218] illustrant bien le paradoxe, encore mal compris, de l'inflammation dans le développement tumoral.

Plusieurs facteurs augmentés durant l'obésité comme les FFA, le cholestérol, l'hyperglycémie et les ROS stimule les récepteurs de type NOD, de type TLR et l'activité de l'inflammasome à domaine pyrine contenant 3 (NLRP3) et induisent la production de cytokines

inflammatoires comme l'IL-1 β [205]. Certains polymorphismes dans le gène codant pour IL-1 β sont associés à un risque accru de cancer et une expression tumorale accrue de l'IL-1 β est associée à un mauvais pronostic [219, 220].

L'IL-6 a aussi été fortement impliquée dans le développement et la croissance de divers cancers [221]. Les niveaux d'IL-6 circulant ont d'ailleurs été rapportés pour corrélés avec l'IMC [222]. On sait que L'IL-6 induit la voie de signalisation de JAK/STAT, ce qui a pour effet d'accentuer la prolifération et la survie des cellules cancéreuses ainsi que l'angiogenèse [223]. Les taux plasmatiques d'IL-6 sont d'ailleurs un biomarqueur qui corrèle avec l'agressivité et un mauvais pronostic de la maladie [224].

Un autre bon exemple de cytokine protumorale sécrétée en période d'obésité est le cas de PAI-1. Son effet serait principalement sur la vascularisation tumorale et l'invasion métastatique [225-227]. L'expression élevée de PAI-1 a été associée à un mauvais pronostic de cancer du sein chez l'homme [228] et son inhibition réduit le risque de polypes chez les souris (*Apc*)^{min} et de croissance de tumeurs colorectales [229]. La délétion du gène *Serpin1*, codant pour PAI-1, a aussi montré une relation entre son expression, la tumorigénèse et l'invasion tumorale [230, 231].

Il n'est alors pas surprenant de voir que l'activation du facteur de transcription et régulateur central NF- κ B [232] est importante dans le développement de plusieurs cancers, notamment le glioblastome [233], le lymphome [234], le cancer du pancréas [235]. Cependant, il a été rapporté que la délétion de NEMO, une protéine impliquée dans la régulation de NF- κ B dans le foie, engendrait une inactivation de la voie du NF- κ B et une induction de la stéatose et de la tumorigénèse. Cet effet était d'ailleurs accentué dans un modèle d'obésité induite par la diète (*Diet-induced obesity* ou DIO) [236]. Cette étude met bien en évidence une notion importante concernant l'impact de l'inflammation sur le cancer et l'apparent paradoxe de cette association. Il semble que l'inflammation aigüe ait des vertus antitumorales, alors que l'inflammation chronique ait, au contraire, des vertus protumorales. En plus de son rôle dans la transcription de cytokines pro-inflammatoires, NF- κ B affecte aussi la survie cellulaire en régulant positivement les gènes anti-apoptotiques et l'autophagie. Pour accentuer l'effet paradoxal de NF- κ B sur l'oncogénèse, il semble que son effet sur la régulation de l'autophagie puisse avoir des effets autant protumoraux qu'antitumoraux [237].

Mécanismes d'inflammation en obésité

Le concept général, lorsqu'on parle d'immunité, est de parler d'une réaction en 2 temps. La réponse primaire vient des cellules myéloïdes (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, etc.) et assure la réponse immunitaire innée qui génère un environnement attractif pour d'autres cellules myéloïdes et des cellules lymphoïdes (lymphocytes T et B, cellules NK) [238]. Cette première réponse agit de la même manière peu importe l'antigène, la molécule ou la substances en question, qu'il soit d'origine pathogénique (*pathogen-associated molecular pattern* ou PAMP) ou endogène (*danger-associated molecular pattern* ou DAMP) [239]. Par conséquent, bien qu'il s'agisse une réaction très rapide, ce système immunitaire est qualifié de "non spécifique". Ensuite, la réponse secondaire, assurée par le système immunitaire adaptatif, prend le relais si la menace à l'homéostasie persiste. Néanmoins, la réponse immunitaire innée est cruciale à l'activation de la réponse immunité adaptative [238]. L'immunité adaptative, bien que plus lente à réagir (entre 4 et 7 jours), est plus spécifique que la réponse innée et a l'avantage de générer une mémoire immunitaire [240]. De facto, lors d'une nouvelle atteinte par un PAMP ou un DAMP, la réponse du système immunitaire adaptatif est plus rapide. Ce concept est d'ailleurs à la base de l'immunisation vaccinale. Néanmoins, la littérature tend maintenant à montrer que le système immunitaire inné peut aussi générer une mémoire immunitaire que l'on appelle immunité entraînée [241]. Celle-ci peut notamment influencer l'évolution de conditions comme les maladies cardiovasculaires artérioscléreuses [242, 243], l'athérosclérose [244, 245], l'hypercholestérolémie [246], les maladies neurodégénératives [247-249], la transplantation d'organe [250] et même le cancer [251-254] [Fournier, Hata *et al*, en cours]. C'est donc dire que l'activation chronique des mécanismes inflammatoires du système immunitaire inné tend à générer un environnement dommageable. En obésité, il devient de plus en plus évident que l'inflammation chronique et l'immunité entraînée, résultant de l'abondance des ligands et alarmines reconnus par le système immunitaire, constitue la base sur laquelle s'appuie le développement de maladies inflammatoires chroniques [255]. En plus des produits microbiens, certains ligands comme les lipoprotéines à basse densité oxydées (oxLDL), la lipoprotéine a, les phospholipides ou même le HMGB1 peuvent induire une immunité entraînée [256, 257].

Au niveau cellulaire, il est maintenant accepté qu'une caractéristique acquise de l'obésité soit l'infiltration massive de macrophages dans le tissu adipeux [258, 259]. De façon intéressante, la déficience en cellule T CD8⁺ ou en CD4⁺ résidents dans le tissu adipeux semble aussi protéger

les souris obèses de l'inflammation adipeuse et de la résistance à l'insuline [260, 261]. Les cellules NK, aussi augmentées en obésité, participent à l'inflammation du syndrome métabolique via, notamment, la production de l'IFN γ dans le tissu adipeux [262]. Il a même été démontré que leur déplétion réduit l'accumulation de macrophages dans les tissus adipeux dans un modèle induit par la diète. Ces données montrent bien l'interdépendance des différents systèmes immunitaires dans l'inflammation induite par l'obésité où les macrophages semblent jouer un rôle central.

En effet, suite à des données montrant un rôle potentiellement protecteur des macrophages sur l'homéostasie adipeuse [263], il devient maintenant clair que la polarisation pro-inflammatoire des macrophages (M1) est à l'origine de plusieurs conditions du syndrome métabolique. L'obésité et la prise de poids induite par la diète entraînent un changement de l'état d'activation des macrophages d'un état polarisé M2 (alternativement activé), ou protecteur contre l'inflammation, à un état pro-inflammatoire M1. Pourtant, l'accumulation de macrophages alternativement activés au sein du MET (*Tumour-associated macrophages* ou TAMs) joue un rôle majeur sur la tumorigénèse via notamment la promotion d'un environnement immunosuppresseur qui favorise aussi l'angiogénèse, les métastases et la résistance aux thérapies [264]. Spécifiquement, le système immunitaire inné agit de façon à protéger la masse nouvellement formée en inhibant les mécanismes de rejet par le système adaptatif via un remodelage des réponses immunitaires dans le MET [265]. Concrètement, on observe une diminution de la réponse Th1 pro-inflammatoires au profit d'une activité Th2 et T régulatrice via, notamment, la sécrétion de d'IL-4, d'IL-10, du TGF- β , d'Arginase 1 et des facteurs de croissances CSF1 et GM-CSF [266-270]. La présence des TAMs, en plus d'inhiber l'action des lymphocytes T CD8⁺ via l'expression de l'antigène leucocytaire humain G (HLA-G) et des cytokines anti-inflammatoires, favorisent fortement l'angiogénèse en sécrétant le VEGF, le TGF- β et le FGF [271], ce qui augmente la capacité invasive des cellules tumorales. De plus, les TAMs peuvent agir directement sur la réponse des lymphocytes T en favorisant l'expression des ligands de PD-1 (PD-L1, PD-L2) et CTLA-4 (CD80/CD86) [272-274]. En plus des macrophages à proprement parlé, il existe une littérature abondante sur un groupe de cellules collectivement appelées cellules suppressives dérivées de myéloïdes (*myeloid-derived suppressor cells* ou MDSC) qui s'accumulent dans la rate et les tumeurs au cours de la progression maligne [275]. Ces cellules peuvent supprimer les réponses des lymphocytes T en *ex vivo* et bloquer la maturation des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes [276]. Leur effet immunosuppresseur serait surtout via la forte expression de TGF- β et Arginase 1 [276, 277]. Deux

articles récents montrent aussi l'effet pervers de l'obésité sur la diminution de l'infiltration des lymphocytes T et de leur capacité effectrices [278, 279].

D'autres cellules comme les lymphocytes B, les mastocytes, les cellules NK et les neutrophiles participent également à la régulation de l'inflammation dans les tissus adipeux en relation avec les macrophages [261]. Tous ces effets aident à l'épanouissement du néoplasme et à son évaison du site de croissance primaire. En somme, l'inflammation chronique joue des rôles clefs sur le développement tumorale. Les mécanismes et dynamiques cellulaires ainsi que plusieurs biomarqueurs sont bien documentés, mais les mécanismes et les programmes moléculaires à l'origine de l'évasion tumorale restent, pour la plupart, mal caractérisés. Ceci dit, beaucoup de travail est mis en œuvre pour élucider ces processus et permettre de proposer de meilleures stratégies thérapeutiques.

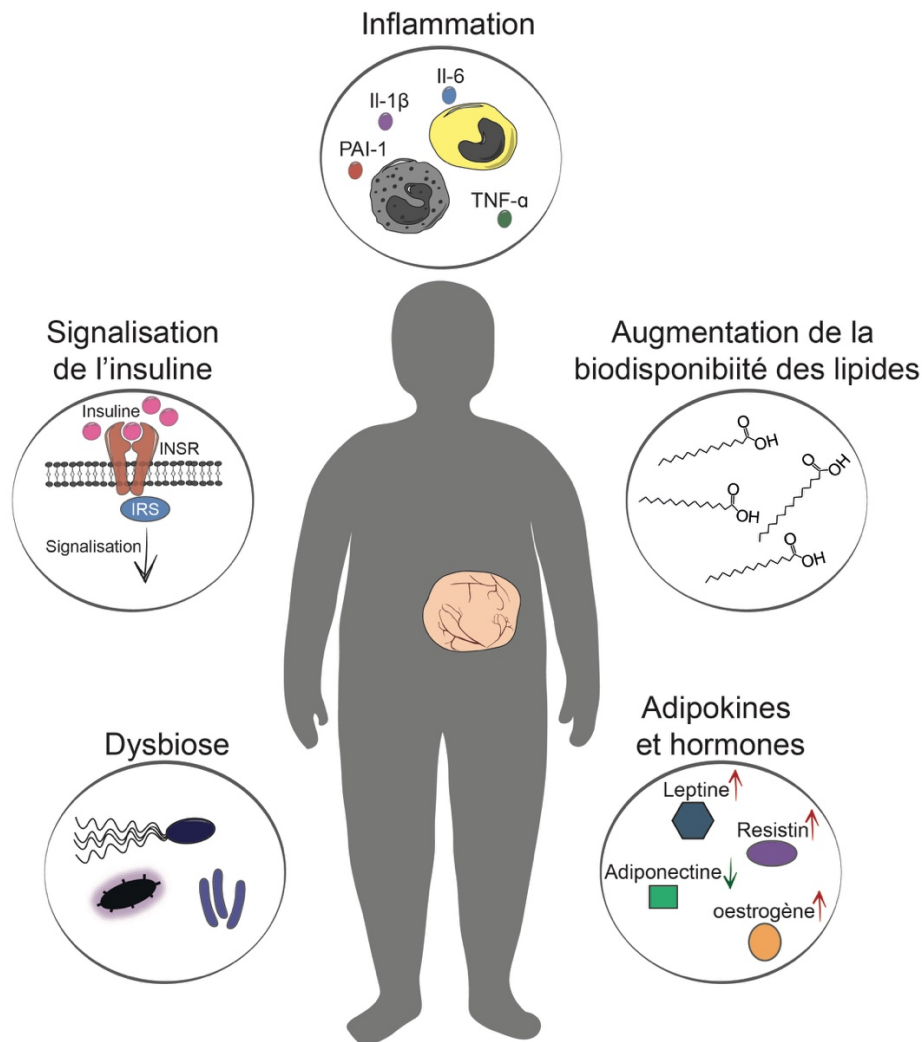


Figure 1. – Schéma illustrant le lien moléculaire entre l'obésité et le cancer.

Les causes moléculaires principalement décrites pour participer au développement du cancer en obésité sont l'augmentation de la biodisponibilité des lipides, la signalisation soutenue de l'insuline, l'altération du microbiote intestinal (dysbiose), le déséquilibre et la signalisation des adipokines et des hormones et l'inflammation.

1.4 Traitements du cancer

1.4.1 Traitements cytotoxiques

Les traitements cytotoxiques classiques, soit la radiothérapie (radiation) et la chimiothérapie (ex. agents altérant l'ADN, antimétabolites, antimitotiques, antibiotiques antitumoraux, inhibiteur des enzymes de réparation de l'ADN), qui visent à induire des dommages aux cellules cancéreuses prolifératives et induire leur mort ont longtemps été, et sont toujours, des traitements de choix contre le cancer [280]. Mise de l'avant par Paul Ehrlich au début du 20^e siècle, la chimiothérapie a d'abord été développée pour traiter les maladies infectieuses [281]. Plus tard, en 1955, l'effort national de développement de médicaments fût fondé sous le nom de *Cancer Chemotherapy National Service Center* ce qui donnait sa notoriété aux médicaments de chimiothérapie [281].

Concernant la radiothérapie, jusqu'en 1960, cette procédure, conjointement avec la chirurgie était les approches thérapeutiques privilégiées. D'ailleurs, la radiothérapie reste le traitement de choix dans environ 65% des traitements du cancer dans les pays occidentaux [282]. Pour cause, l'optimisation des traitements et les avancées technologiques dans les traitements de radiothérapie conformationnelle 3D, comme la radiothérapie stéréotaxique, la radiothérapie à modulation d'intensité et la radiothérapie guidée par l'image, nous permettent d'administrer des doses de rayonnement de façon plus précise et spécifique à la masse maligne [283]. L'amélioration des traitements radiothérapeutiques a d'ailleurs eu un impact majeur sur le taux de survie globale des patients (de 30% à 80% en 20 ans) pour certains cancers [282, 283]. Néanmoins, dans plusieurs cas, les traitements locaux (ex. radiothérapie, chirurgie) n'avaient que peu d'impact, surtout lors de l'apparition de métastases. Alors, des stratégies combinatoires avec la chimiothérapie étaient mises de l'avant [281, 284, 285]. Néanmoins, ces stratégies, bien qu'encore fortement utilisés aujourd'hui, ne sont pas sans effets secondaires et leur efficacité est hautement variable. Par

exemple, l'accessibilité physiologique et le faible niveau de perfusion de certaines tumeurs solides diminue l'efficacité de ces thérapies. D'ailleurs, les stratégies visant la restauration d'une perfusion et d'une perméabilité tumorales adéquates sont activement investiguées [286, 287]. De plus, plusieurs cancers restent insensibles aux traitements cytotoxiques classiques et récidivent en raison de résistances acquises comme l'acquisition de cellules souches cancéreuses ou de cellules sénescents dans le MET comme nous le verrons plus bas [288, 289]. Des traitements plus ciblés sont donc visés pour améliorer leur efficacité et spécificité.

En outre, la virothérapie oncolytique (OVT) est aussi une avenue thérapeutique avec volet cytotoxique. En effet, depuis la fin des années 1940, on reconnaît la capacité de certains virus à éliminer les cellules cancéreuses et de plus en plus de groupes essaient de prendre avantage de cette caractéristique des virus [290, 291]. La stratégie OVT vise à trouver et infecter les cellules tumorales spécifiquement avec un virus natif ou modifié qui se réplique sélectivement dans les cellules tumorales, pour éliminer directement les cellules cancéreuses ou engendrer une réponse immunitaire contre ces cellules [292]. Plusieurs virus comme l'herpèsvirus, l'adénovirus, le poxvirus, le picornavirus et le réovirus sont actuellement étudiés pour leur potentiel comme traitement oncolytique [293]. D'ailleurs, en 2015, le *talimogène herparepvec* a été le premier virus oncolytique à avoir été approuvé par le FDA [294]. Pour restreindre sélectivement l'activité cytotoxique aux cellules tumorales, on utilise notamment le ciblage transcriptionnel (promoteurs spécifiques à la tumeur), les modifications génétiques ou chimiques de la capsid virale pour augmenter la spécificité de la liaison aux récepteurs régulés des cellules cancéreuses, l'altération de gènes viraux qui profiteront d'une voie surexprimée dans les cellules cancéreuses spécifiquement et la régulation basée sur les microARN de l'expression des gènes viraux [295, 296]. Ceci dit, les résultats les plus encourageants de l'OVT restent associés à l'administration intra-tumorale pour limiter les effets hors cible, que ce soit en monothérapie [297-300] ou en thérapie combinatoire [301-303]. Évidemment, l'effet de cette procédure reste limité aux tumeurs relativement accessibles et délimitées. L'administration systémique de virus oncolytique reste une application en étude, mais qui pose plusieurs questions sur la sécurité et la biodisponibilité en clinique. Par exemple, bien que les virus utilisés comme vecteur thérapeutique ne soient pas des agents pathogènes à diffusion hématogène et/ou qui n'infectent normalement pas les humains, une dose élevée pourrait tout de même induire une forte réponse antivirale et l'infection de cellules non-cancéreuses [304]. Cette dernière conséquence affecte autant la spécificité du traitement que

sa biodisponibilité pour les cellules malignes. En connaissance de cause, un travail considérable a été effectué pour optimiser les virus oncolytiques en atténuant la pathogénicité et en améliorant l'immunogénicité [305]. Néanmoins, il est intéressant de voir la tangente explorée dans cet axe de recherche où l'effet immuno-thérapeutique et immunogénique devient aussi important que leur effet oncolytique [306-309].

1.4.2 Immunogénicité et immunothérapie

L'une des options de traitement la plus étudiée et la plus encourageante actuellement est probablement l'immunothérapie. Cette avenue thérapeutique repose sur le concept d'immunogénicité, défini généralement comme la capacité de l'hôte à produire une réponse immunitaire adaptative efficace [310] (**Figure 2**). Au sens de la recherche, le concept d'immunogénicité vient de la capacité d'une souris à rejeter une inoculation tumorale secondaire suite à une inoculation primaire servant d'induction immunitaire [311]. Si une tumeur se forme, les cellules sont peu immunogènes et vice versa. Typiquement, on sait que les tumeurs formées par des agents hautement mutagènes sont fortement immunogènes [311, 312] alors que, généralement, les tumeurs spontanées, comme les lignées de *Lewis lung carcinoma* (LLC), de mélanome B16 et de cancer du sein 4T1, sont de faiblement à modérément immunogènes puisqu'elles ne forment pas ou peu de tumeurs secondaires [313-316]. D'autres lignées de cellules provenant de tumeurs spontanées, comme celle de l'adénocarcinome du colon MC-38, sont toutefois considérées comme fortement immunogènes dû à leur forte réponse en cellules T [311, 316]. En accord avec ce concept, des études classiques ont montré que la mutagénèse *ex vivo* de lignées faiblement immunogènes génère des variants incapables de développer une tumeur [317-320]. Ces études mettent en lumière une idée importante concernant l'immunogénicité. En fait, l'immunogénicité comporte deux éléments importants, soit (1) l'habilité des cellules T à initier une réponse immunitaire suite à l'inoculation tumorale et (2) l'habilité des cellules T à répondre aux signaux immunitaires régulateurs [311]. Un exemple parfait pour illustrer ce concept est le cas de tumeurs B16. Ces tumeurs peuvent être contrôlées avec aussi peu que 10^4 lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à la tumeur, alors que l'inoculation seule de cette lignée de cellules tumorales ne génère pas suffisamment de lymphocytes T pour contrôler la croissance tumorale [321]. Par contre, ces tumeurs sont résistantes à une immunothérapie visant à inhiber les points de contrôle de l'activité des cellules T [322, 323]. Cette distinction illustre bien la différence entre générer une réponse

immunitaire antitumorale initiale et être sensible au contrôle immunitaire. De surcroît, il est typique d’observer un ratio de cellule myéloïde/lymphocyte positif dans un MET immunosuppresseur [324-327]. Ainsi, non seulement les lymphocytes T sont importants dans l’immunogénicité, mais l’abondance des cellules myéloïdes et leur impact sur le recrutement des cellules lymphocytaires sont des facteurs importants dans la réactivité immunitaire contre les cellules cancéreuses.

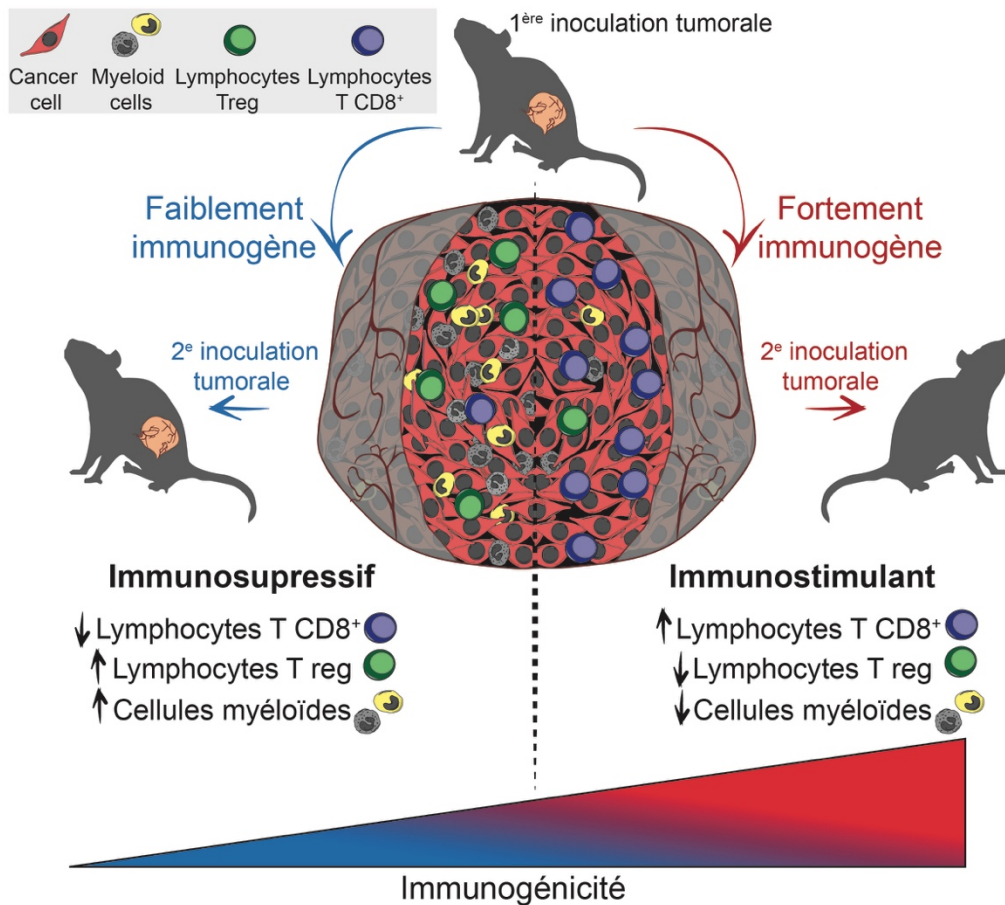


Figure 2. – Schéma illustrant le concept d’immunogénicité tumorale au sens de la recherche.

Dans un modèle murin, l’inoculation primaire de cellules tumorales, de façon syngénique, produit une réaction immunitaire. Suite à cette première inoculation, l’attraction de lymphocytes T CD8⁺ et leur capacité à reconnaître les cellules cancéreuses détermine l’intensité de la réaction immunogénique et dicte la capacité de croissance tumorale lors d’une seconde inoculation de cellules cancéreuses.

Lymphocytes et immunothérapie

Ainsi, l’idée derrière l’immunothérapie est d’augmenter l’immunogénicité de la tumeur à traiter. Cela se fait via des stratégies d’immunothérapie (1) non-spécifiques, comme les agonistes

des récepteurs TLRs (ex. Imiquimod) ou le traitement par administration d'interleukines (ex. Proleukin), ou (2) spécifiques comme les anticorps monoclonaux (ex. Rituximab) ou les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ex. PD1/PDL1) [328]. Ceci dit, la recherche entourant l'immunothérapie et la compréhension des mécanismes de régulation du système immunitaire adaptatif ont obligatoirement concentré les efforts de recherche sur les lymphocytes T. C'est donc dire que beaucoup moins de travaux tentent de comprendre comment les cellules du système immunitaire inné sont affectés par une condition qui induit l'épuisement et la régulation immunitaire. Les récepteurs d'antigènes chimériques-cellules T (*chimeric antigen receptors* ou CAR-T cells), qui ont récemment révolutionné le monde de l'immunothérapie, en sont un bon exemple [329]. Ces CAR sont des récepteurs synthétiques conçus pour diriger les lymphocytes vers des cellules exprimant un antigène spécifique indépendamment du récepteur du CMH [330]. En 2017, une thérapie anti-CD19 CAR-T a obtenu des succès cliniques important contre les tumeurs malignes à cellules B a été approuvé par le FDA [331-333]. Évidemment, ce succès n'a fait qu'amplifier la popularité et l'importance mise sur l'étude des lymphocytes dans les thérapies anti-cancéreuses.

L'immunothérapie de type blocage des points de contrôle immunitaire (*immune checkpoint blockade* ou ICB) est aussi une stratégie prometteuse pour les patients atteints du cancer. Cette thérapie permet aux lymphocytes T réactifs aux tumeurs de monter une réponse antitumorale efficace en supprimant les signaux inhibiteurs de l'activation des lymphocytes T [334]. En condition physiologique, ces mécanismes de régulation sont toutefois nécessaires pour éviter les réponses auto-immunes et contrôler l'activité immunitaire [335]. Le développement des cellules T fait appel à deux mécanismes de régulation de la tolérance, soit la tolérance centrale et périphérique [336]. La tolérance centrale (thymus) consiste en la sélection négative des clones auto-réactifs et la tolérance périphérique est médié par les lymphocytes T régulateurs (Tregs), l'anergie des lymphocytes T, soit le processus permettant la tolérance immunitaire vis-à-vis de ses propres cellules en reconnaissant certaines molécules dites du soi, et des signaux extrinsèques. Ceci dit, une partie de la tolérance est influencée systématiquement par les signaux environnementaux. Cette pression sélective exercée sur le système immunitaire est continue tout au long de la progression de la tumeur, ce qui permet l'évasion immunitaire du cancer et qui peut expliquer la difficulté de traiter des cancers à stades avancés [337]. Les molécules *Anti-cytotoxique T-lymphocyte antigen-4* (CTLA-4), qui atténuent l'activation des lymphocytes T par costimulation négative, et *Programmed*

Cell Death-1 (PD-1), qui limite la réponse des lymphocytes T à un niveau souhaité, sont les deux facteurs principaux de la régulation des lymphocytes T. Néanmoins, LAG3, TIM3, TIGIT, VISTA et ICOS de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) et OX40, GITR, 4-1BB, CD40 et CD27 de la superfamille du récepteur du TNF (TNFRSF) sont aussi notamment connus et étudiés pour leur impact sur la régulation immunitaire [335]. Ainsi, le FDA a approuvé plusieurs anticorps conçus pour traiter de nombreux types de tumeurs en ciblant ces protéines [335].

Cellules myéloïdes et immunothérapie

Néanmoins, comme il a été soulevé plus tôt, l'immunogénicité repose non seulement sur l'efficacité de la réponse cytotoxique au site tumoral, mais aussi sur l'infiltration de cellules immunitaires dans les tumeurs [338]. C'est notamment ce qui explique que certaines stratégies de traitements immuno-thérapeutiques se sont avérées apporter de faibles bénéfices cliniques chez certains patients. Pour adresser cette problématique, les stratégies de thérapies combinatoires sont maintenant mises de l'avant. La combinaison de l'immunothérapie avec le traitement de radiothérapie ou aux agonistes des récepteurs TLRs ont donné des résultats encourageants [339-341]. En libérant une grande quantité d'antigènes tumoraux, les effets cytotoxiques de la radiothérapie peuvent synergiser avec l'induction d'une réponse immunitaire spécifique de la tumeur [342]. En exploitant une stratégie similaire sur la production d'antigène (effet adjuvant), les agonistes des TLRs induisent l'activation des cellules présentatrices d'antigènes et favorisent les réponses immunitaires de type Th1 [343-345]. Parmi les agonistes de TLR approuvés pour leur utilisation dans le traitement du cancer, on compte notamment le *Bacillus Calmette-Guérin*, un agoniste des TLR2 et TLR4, le monophosphoryle lipide A du LPS, un agoniste du TLR4 et l'imiquimod, un agoniste du TLR7 [346, 347]. D'ailleurs, une étude récente montrait que la brucella lumazine synthase (BLS), une protéine hautement immunogène aux propriétés adjuvantes qui active les cellules dendritiques via le récepteur TLR4 [348], peut être utilisée en thérapie combinatoire pour améliorer l'effet thérapeutique de l'ICB [349]. De façon intéressante, l'administration du BLS augmentait significativement l'efficacité du traitement ICB (anti PD-1) dans les stades précoces du développement de mélanome B16, mais pas dans les stades avancés. Il semble donc que le stade de développement ait aussi un impact sur le comportement immunitaire et sa réactivité.

L'effet des cellules dendritiques sur l'activation d'une réponse immunitaire antitumorale via, notamment, la signalisation des récepteurs PRRs (*pattern recognition receptors*), peut aussi être exploitée [350]. Par contre, ces mêmes cellules participent aussi à l'induction de la tolérance des cellules T périphériques pour limiter le phénomène d'auto-immunité [351, 352] et le niveau de cellules dendritiques est étroitement et positivement lié au nombre de cellules Tregs [353]. La régulation de l'auto-immunité via l'expansion de Tregs est aussi favorisée par la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs comme le TGF- β [354-356], l'IL-10, les corticostéroïdes ou même la rapamicine [357]. D'ailleurs, le transfert adoptif de cellules dendritiques stimulés par ces agents qui agissent sur la tolérance immunitaire peut être exploitée à des fins thérapeutiques [357]. Récemment il a été démontré que la voie JAK-STAT, en aval des récepteurs TLRs, sont clefs dans la promotion de la tolérance par les cellules dendritiques, dans un modèle d'auto-immunité, via l'induction PD-L1-dépendante de la régulation des cellules T [358]. De façon intéressante, il avait préalablement été montré que la signalisation STAT1 était nécessaire pour les réponses Th1 des cellules dendritiques [359, 360].

Dans une autre étude, un groupe montrait une application prometteuse de l'immunothérapie en se servant de la chorismate mutase, un facteur de virulence putatif de *Mycobacterium tuberculosis*. Ce groupe montre qu'il est possible d'augmenter l'efficacité des traitements de carcinomes faiblement immunogènes du LLC via la signalisation de TLR4 [361]. De façon intéressante, une autre étude récente montre pourtant que le prétraitement de souris avec une dose unique d'un antigène pathogénique comme le β -glucan (fongique), entraîne une diminution de la croissance tumorale suite à la reprogrammation de la granulopoïèse et la polarisation spécifique des neutrophiles dans un état qui augmente la réponse immunitaire Th1 [252]. Dans une étude en cours au laboratoire, nous montrons d'ailleurs des effets analogues avec des prétraitements au LPS [Fournier, Hata *et al*, en cours]. Néanmoins, nous montrons aussi que des injections répétées du même antigène a un effet diamétralement opposé et accélère la croissance des tumeurs. Ainsi, l'utilisation de ces modèles circonscrits à un activateur unique illustre bien l'effet d'une activation chronique sur l'épuisement d'une réponse immunitaire efficace.

En somme, un groupe a récemment montré que l'administration du LPS, le ligand principal de TLR4, favorisait l'infiltration des lymphocytes T, mais aussi leur épuisement dans un modèle de cancer orthotopique [362]. En effet, il semble que la signalisation TLR4/MyD88/AKT/NF- κ B participe à la transcription de PD-L1 médiée par le LPS. Cette étude justifie aussi l'utilisation de

thérapie combinatoire pour le traitement du cancer. De surcroît, il est intéressant de remarquer que, autant les agonistes des TLRs peuvent augmenter la réactivité du système immunitaire, autant ils ont le potentiel d'engendrer une régulation du système immunitaire adaptatif. Cette idée ramène au concept d'immunité entraînée et d'épuisement de la réponse immunitaire. Comme il en sera question plus bas, la littérature fait état de la notion d'immunosénescence pour caractériser ce phénomène et regrouper les mécanismes menant à l'altération de la réponse immunitaire.

1.5 Sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire, dérivée du mot latin *senex* signifiant «vieux» et décrite pour la première fois en 1961 par Hayflick [363], est un arrêt généralement, mais pas exclusivement [364-367], irréversible du cycle cellulaire. Ce programme cellulaire est d'une grande importance pour l'initiation de programmes contrôlés comme lors du développement embryonnaire [368, 369] ou la réparation et la régénération des tissus [370, 371]. Elle peut néanmoins aussi être initiée par un stress endogène comme le dysfonctionnement des télomères ou l'activation des oncogènes [372, 373] ou un stress de l'environnement comme la carence en nutriments ou l'accumulation de ROS [374]. Dans le cas du déclenchement des mécanismes de sénescence par un stress incontrôlé, nous parlons alors de sénescence prématurée. La sénescence cellulaire vise à arrêter la prolifération d'une cellule dysfonctionnelle. Il s'agit d'un processus évolutif qui, en parallèle avec la mort programmée ou l'apoptose, permet le maintien de l'homéostasie tissulaire [375]. La cellule en question subit des changements dans sa signature moléculaire qui induit sa propre élimination, le recrutement de cellules immunitaire et phagocytaires et la mobilisation de cellules progénitrices pour permettre le retour à l'homéostasie [376]. Pour cette raison, les programmes de sénescence cellulaire ont longtemps été vus comme strictement protecteurs et anti-cancéreux [10]. Cependant, l'inefficacité à éliminer les cellules endommagées et sénescentes mène à leur accumulation. Dans ce cas, il y aura création d'une niche pro-inflammatoire, qui, sans intervention, peut se traduire par l'établissement de manifestations pathologiques variées comme il sera abordé plus bas [377].

Plusieurs caractéristiques cellulaires et moléculaires sont typiques de ce phénomène et peuvent être exploités pour identifier ces cellules (**Figure 3**). Les marqueurs connus sont notamment : l'activité de l'enzyme lysosomale β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal), les changements morphologiques (élargissement et aplatissement cellulaire, perturbation de la membrane nucléaire), l'absence de l'expression de marqueurs de prolifération comme Ki-67 et

PCNA, la forte expression des régulateurs du cycle cellulaire comme les membres des signalisations p16^{INK4a}, p53/p21^{CIP1} ou 27^{kip} et des protéines impliquées dans les voies anti-apoptotiques comme la famille BCL-2, des foci témoignant de la réorganisation de la chromatine (*senescence-associated heterochromatin foci* ou SAHF) des marqueurs de dommages à l'ADN persistants formant les *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence* ou DNA-SCARS (ex. γ H2A.x, PML, 53BP1), l'établissement d'un surfaceome (ex. ICAM-1, NOTCH1, NOTCH3, DEP1, B2M, DPP4 STX4, NTAL et uPAR) et l'induction d'un sécrétome associé à la sénescence cellulaire (*senescence-associated secretory phenotype* ou SASP) composé de cytokines, de chimiokines, de facteurs de croissance, de protéases et des facteurs de remodelage de la matrice extracellulaire [378, 379]. La détection de plusieurs de ces facteurs augmente la probabilité d'être en présence de cellules sénescents, sans toutefois le garantir. Sans meilleur système d'évaluation pour identifier les cellules sénescents, la majorité des études vont jumeler plusieurs marqueurs pour diminuer leurs chances de mal catégoriser un groupe cellulaire en tant que cellules sénescents [379]. Par exemple, il serait possible de mal catégoriser une cellule immunitaire comme sénescente dans un contexte inflammatoire par l'évaluation stricte de la SA- β -gal et de l'expression de cytokines du SASP. En effet, l'activité de la β -galactosidase, une glycoside hydrolase lysosomale [380], joue un rôle primordial dans le catabolisme des chaînes oligosaccharidiques contenant du galactose [381] et est intimement lié à l'activité lysosomale élevée [382, 383] comme c'est le cas pour les cellules sécrétoires comme les fibroblastes et certaines cellules immunitaires [383, 384]. Néanmoins, l'activité β -galactosidase est largement utilisée et ce, depuis longtemps, pour caractériser le suivi et l'agressivité tumorale [385-389] et la sénescence cellulaire [390]. Des études sont donc requises pour améliorer la spécificité des stratégies d'identification de cellules sénescents.

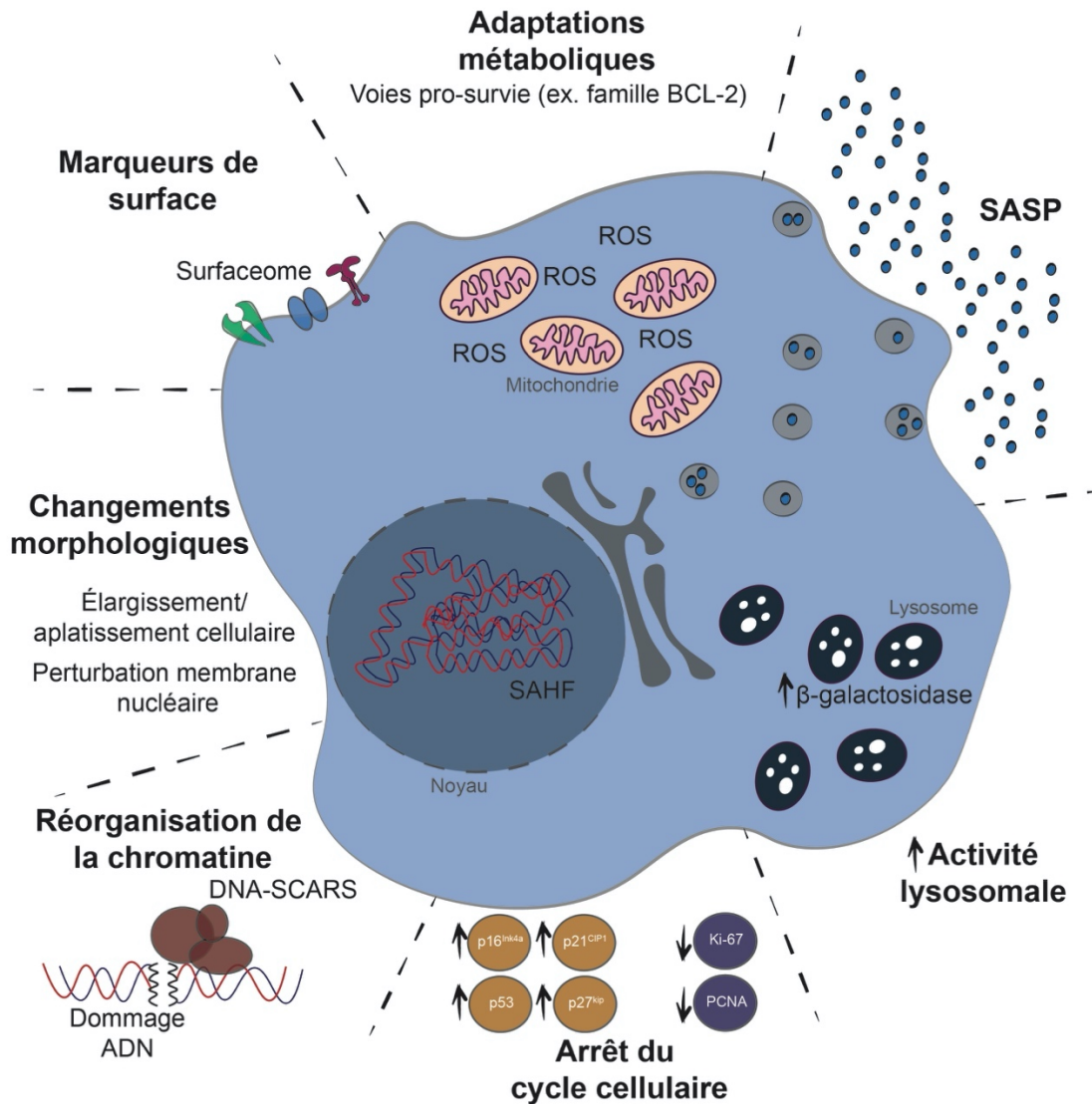


Figure 3. – Schéma illustrant les caractéristiques principales permettant l'identification des cellules sénescentes (Inspiré de la revue par González-Gualda et al. [379]).

La combinaison de plusieurs de ces caractéristiques (adaptation métabolique, marqueurs de surface, changements morphologique, réorganisation de la chromatine, arrêt du cycle cellulaire, augmentation de l'activité lysosomale et sécrétion du SASP) permet de suspecter la présence de cellules sénescentes.

1.5.1 Immunosénescence

L'immunosénescence, décrite comme un déclin des fonctions des systèmes immunitaires inné et adaptatif associés à l'inflammation chronique lié à l'âge (*inflammageing*) [391], est un sujet controversé et encore mal compris. Un stress inflammatoire systémique et prolongé comme lors

d'une infection chronique, d'un traitement prolongé du cancer ou de l'obésité sont des phénomènes physiologiques qui engendrent ce genre d'épuisement du système immunitaire [391]. Conséquemment, le système immunitaire développe une susceptibilité accrue aux infections et au cancer puisqu'il génère des réponses affaiblies face aux nouveaux antigènes. D'ailleurs, la littérature étudiant les parallèles entre le vieillissement et l'obésité suggère que l'embonpoint soit une caractéristique directement liée à l'accélération du vieillissement [392-394]. Plusieurs études démontrent que l'obésité accélère le vieillissement, notamment via le raccourcissement des télomères et le vieillissement épigénétique [395-399]. Ce vieillissement du système immunitaire, décrit comme l'immunosénescence, a été rapportée pour mener à l'affaiblissement des fonctions des organes non-lymphoïdes [400]. Ceci dit, l'immunosénescence est mieux caractérisée chez les cellules du système immunitaire adaptatif. En effet, on observe une accumulation des lymphocytes T mémoires effecteurs pro-inflammatoires, une diminution des réservoirs de cellules T naïfs et une accumulation de cellules effectrices épuisées, ce qui se traduit par une inefficacité à répondre aux nouvelles présentations antigéniques [401-404]. En parallèle, les cellules de la lignée myéloïdes ne sont toutefois pas épargnées. Leur nombre semble accroître avec l'âge et l'immunosénescence semble affecter négativement l'expression des TLRs à leur surface, ce qui impacte la reconnaissance antigénique [405, 406].

De façon intéressante, il est suggéré que plus le fardeau tumoral (*tumour burden*) est grand et plus le stade du cancer est avancé, pire est le pronostic et l'efficacité des traitements d'immunothérapie [407]. Le fait est que l'impact du vieillissement du système immunitaire impacterait sa capacité à combattre le cancer, même suite à un traitement servant à augmenter l'immunogénicité [407]. C'est d'ailleurs ce qui explique la montée en popularité des études investiguant l'efficacité des thérapies combinatoires jumelant les agonistes des TLRs et l'immunothérapie spécifique. Le concept liant la progression tumorale vers des stades avancés et l'évasion du système immunitaire est important considérant l'importance de l'obésité sur l'efficacité de la réponse immunitaire. Il est donc primordial d'investiguer les bases moléculaires qui expliquent comment la sénescence cellulaire puisse avoir un effet aussi pervers sur la progression tumorale à des stades avancés.

Sénescence et obésité

Durant l'obésité, différents ligands engendrent des réponses antigéniques de façon chronique, ce qui provoque l'*inflammageing* et l'immunosénescence de façon prématurée [391] (Revue des ligands plus bas). Conséquemment, plusieurs groupes ont rapporté que des cellules sénescentes s'accumulaient dans plusieurs organes au cours de l'obésité entraînant une accumulation de graisse, des conséquences métaboliques, voire de l'anxiété et de la neurogénèse [408-411]. Néanmoins, la contribution exacte des différents types cellulaires impliqués dans la sénescence des tissus adipeux est encore en investigation. L'accumulation de ROS serait une cause principale d'induction de cette sénescence via l'activation de la voie p53/p21^{CIP} [412]. En effet, l'exercice ou l'utilisation d'un antioxydant (N-acétylcystéine) réduit l'abondance des cellules sénescentes dans le tissu adipeux et leur impact néfaste sur l'*inflammageing* [413, 414]. Dans ces deux dernières études, les auteurs se sont concentrés sur la sénescence dans les adipocytes matures et ont montré une réponse aux dommages à l'ADN (*DNA damage response* ou DDR) importante accompagnée de facteurs inflammatoires associés à un SASP. Une autre étude récente a d'ailleurs émis des conclusions similaires sur l'installation d'une DDR, mais a montré que cette réponse était très rapide [415]. Deux semaines seulement après le début d'une diète riche en gras, les adipocytes présentaient un niveau élevé de ROS, de marqueurs de dommage à l'ADN et de régulation du cycle cellulaire. C'est donc dire que l'apparition de signes de sénescence cellulaire précède les symptômes d'obésité comme le développement de l'inflammation du tissu adipeux, la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose. Chez l'homme, des données récentes suggèrent qu'un processus similaire puisse avoir lieu dans le tissu adipeux sous-cutané [416]. De façon intéressante, un groupe a récemment identifié une population d'adipocytes sénescents qui, malgré leur incapacité habituelle à se diviser, affichent une signature génique et protéique indiquant un programme de cycle cellulaire actif [417]. L'identification de ce programme dans les tissus adipeux de souris et humains est associée au dysfonctionnement du tissu adipeux dans l'obésité et l'hyper-insulinémie. En bloquant le SASP à l'aide de la metformine, ils arrivent à atténuer la sénescence des adipocytes et l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité, ce qui souligne l'impact de ces cellules adipeuses qui semblent ré-entrer en division. Comme nous le verrons, les cellules cancéreuses sénescentes peuvent aussi adopter un comportement similaire.

L'induction de la sénescence est aussi documentée dans les cellules mitotiques du tissu adipeux. D'abord, les préadipocytes, essentiels pour le renouvellement et le maintien d'un tissu

adipeux sain, peuvent devenir sénescents, soit par épuisement prolifératif pendant le vieillissement, soit par un stress oxydatif accru dans l'obésité [418-420]. Évidemment, l'entrée en sénescence de ces cellules affecte grandement le potentiel de prolifération et de différenciation des cellules adipeuses. De plus, les préadipocytes sénescents induits par l'irradiation ou un stress réplicatif induisent un SASP contribuant à l'infiltration massive de macrophages observée en contexte inflammatoire qui accompagne l'obésité [421]. Cet effet du SASP affecte aussi la capacité adipogénique des cellules progénitrices [410, 421]. Dans cette même étude, les auteurs dénotent aussi un effet de l'élimination de cellules sénescents du tissu adipeux sur l'hypertrophie des cellules adipeuses. Cela suggère donc, encore une fois, que l'expansion adipeuse peut être causée par l'accumulation de cellules sénescents directement dans ce tissu. D'un autre côté, l'adipogénèse réduite dans l'obésité hypertrophique et le diabète de type 2 est associée à une sénescence accrue des cellules progénitrices, ce qui montre une interrelation étroite entre la sénescence des préadipocytes et le maintien de la santé du tissu adipeux [422]. De façon intéressante, cette relation est aussi observée chez des patients ayant une prédisposition génétique au diabète de type 2 [423, 424].

Pour finir, les cellules endothéliales peuvent aussi entrer en sénescence et impacter l'homéostasie du tissu adipeux. D'abord, il faut savoir que les cellules endothéliales du tissu adipeux sont des cellules surspécialisées qui, tout comme les cellules adipeuses ont la capacité d'accumuler des gouttelettes lipidiques et expriment des niveaux élevés du facteur de transcription PPAR γ [425]. Ces cellules sont donc sensibles aux ligands de PPAR γ , qui augmente le transport et l'incorporation des lipides. En contrepartie, la délétion de PPAR γ dans les cellules endothéliales altère l'absorption des acides gras des tissus périphériques et conduit à une hyperlipidémie systémique [426]. De façon intéressante, la sénescence cellulaire est associée à une réduction du PPAR γ dans les cellules endothéliales, ce qui est, comme on peut l'imaginer, associé à une diminution de la capacité à répondre aux acides gras [427]. De surcroît, il a été récemment rapporté que les cellules endothéliales du tissu adipeux humain est le joueur clef dans le maintien de l'homéostasie adipeuse via sa sécrétion de ligands lipidiques du PPAR γ , un rôle que ne peuvent assurer les adipocytes seuls [425]. Ainsi, la sénescence, causant une perte de fonction chez les cellules endothéliales spécialisées du tissu adipeux, a une importance majeure sur l'apparition de conditions associées à l'obésité.

1.5.2 Sénescence, pathologies et cancer

Lorsque l'on parle des effets pervers de la sénescence sur le développement pathologique, la production massive du SASP est souvent pointée du doigt comme le facteur causal [375, 376, 428]. Ce programme, en contexte physiologique normal, joue un rôle important de messenger intercellulaire recrutant les phagocytes et autres cellules immunitaires pour la régénération du tissu affecté et le retour à l'homéostasie [429-431]. En effet, le SASP est crucial dans l'établissement de l'immuno-surveillance via le recrutement de cellules T et de macrophages dans les lésions pré-malignes [432]. En contrepartie, plusieurs maladies chroniques associées au vieillissement comme les maladies cardiovasculaires [433], le syndrome métabolique [434], les maladies neurodégénératives [435], l'arthrite [436], l'ostéoporose [437], la sarcopénie [438] et les cancers [439, 440] sont aussi associés à l'établissement d'un SASP. De surcroît, les cellules sénescents et le SASP peuvent aussi participer à la pathogénèse de certaines pathologies indépendantes du vieillissement. Par exemple, des études, dont plusieurs de notre laboratoire, ont démontré un lien clair entre une sénescence cellulaire et la rétinopathie du prématuré [441-444].

Ceci dit, beaucoup de connaissances acquises sur la sénescence cellulaire proviennent d'études sur des fibroblastes non transformés et des cellules épithéliales primaires, ce qui complique l'identification et la caractérisation spécifique de cellules sénescents *in vivo*. En effet, en 2020, un groupe a d'ailleurs pris avantage de ces connaissances pour développer le *SASP Atlas* ; un outil d'identification de cellules sécrétant un SASP à la suite de différents stimuli [445]. Toutefois, la sécrétion du SASP et l'établissement de la sénescence cellulaire sont des processus dynamiques qui dépendent autant des caractéristiques intrinsèques de la cellule d'origine que des stressors déclenchant la sénescence (stress réplicatif, activation des oncogènes, composés nocifs, irradiation, cancérigènes, etc.) et du laps de temps à laquelle une cellule passe en état de sénescence, ce qui ajoute à la complexité d'une identification juste [446-448]. Récemment, une étude a, par exemple, révélé que le SASP était, en fait, la combinaison de deux vagues de production de facteurs distincts [449]. La première vague serait régulé par l'expression de NOTCH1 lié à la membrane et principalement anti-inflammatoire par la forte présence de TGF- β . La sécrétion persistante du SASP mène au maintien de la seconde vague où l'expression de NOTCH1 diminue menant à un environnement globalement pro-inflammatoire. De plus, les signaux transmis par le SASP peuvent aussi provoquer la sénescence des cellules périphériques de façon paracrine [420]. Il faut savoir qu'un arrêt du cycle cellulaire via p16 et p21 n'est pas suffisant pour déclencher une modification

du phénotype sécrétoire [450]. En fait, selon les connaissances actuelles, les principaux déclencheurs d'un SASP sont une réponse au dommage à l'ADN continu, l'état mutationnel de TP53 et l'activation des protéines NF- κ B et C/EBP [451, 452]. L'importance du dommage à l'ADN dans l'établissement de la sénescence est mise en évidence dans un modèle de souris poly $\eta^{-/-}$, qui accumule des dommages importants à l'ADN induisant de la sénescence [413]. De façon intéressante, ces souris prennent du poids rapidement malgré une diète faible en gras soulignant, encore une fois, l'impact de la sénescence et du SASP sur l'obésité et vice versa. Récemment, les voies de signalisation de MAPK, de NOTCH et de mTOR ont aussi été associées à la régulation du SASP [446, 453-455]. Par ailleurs, l'accumulation du stress réplicatif mène à un dysfonctionnement mitochondrial, causé par un stress oxydatif qui promouvoit l'accumulation de dommages à l'ADN et, conséquemment, l'arrêt du cycle cellulaire [456, 457]. Il n'est donc pas surprenant de voir que le rapport mitochondrial NAD⁺/NADH a aussi été associé à la régulation du SASP [458]. Au niveau de la chromatine, la présence de HMGB2 au site de transcription des éléments du SASP est aussi un important facteur participant à sa production [459]. En somme, plusieurs groupes ont proposé des ensembles de gènes qui tentent de définir le plus spécifiquement possible les cellules sénescents (ex. Fridman, Casella, Hernandez, Purcell, etc.) [446, 460-462]. Notre groupe a aussi généré un ensemble de gènes de ce type (Global_Senescence_Literature_Curated_2020) qui a été publié pour la première fois en 2020 dans *Science* [442]. De façon intéressante, plusieurs de ces ensembles de gènes ne partagent que peu de similitudes, ce qui témoigne de la complexité à identifier des cellules sénescents dans un contexte biologique.

Concernant le développement du cancer spécifiquement, un nombre important de données tendent à indiquer que les patients cancéreux recevant des traitements cytotoxiques traditionnels (ex. chimiothérapie, radiothérapie) ont un risque accru de vieillissement physique (douleurs, fatigue, mobilité réduite, perte de force, atrophie musculaire) et cognitif précoce (perte de mémoire court/long terme, problème de concentration, ralentissement de la vitesse psychomotrice, fonction exécutive altérée) [463]. Les changements biologiques associés aux cancers eux-mêmes ou à des traitements plus récents comme l'hormonothérapie ou l'immunothérapie pourraient avoir des impacts similaires [464, 465]. L'accélération du vieillissement, autant cognitif que cellulaire, montre des parallèles importants entre le cancer et l'obésité où la sénescence pourrait jouer un rôle clef. Ces données vont de pair avec la littérature de plus en plus importante mettant en lumière

l'impact de la sénescence cellulaire sur le développement tumoral. Sans surprise, le sécrétome du SASP joue aussi un rôle central via son influence sur la réactivité immunitaire, l'angiogénèse, l'invasion métastatique et la prolifération tumorale [428, 430, 440]. Dans la nouvelle mouture des *Hallmarks of cancer* par Hanahan, les cellules sénescents ont d'ailleurs été officiellement ajoutés comme une caractéristique protumorale acquise [7]. Cet ajout témoigne de l'importance de l'induction des programmes de sénescence, autant pour le développement du cancer que pour le traitement de cette maladie. De façon intéressante, les cellules pré-malignes et les cellules immunitaires ne sont pas les seules qui peuvent entrer en état de sénescence pour impacter le MET. On a aussi rapporté que les fibroblastes associés au cancer (*cancer-associated fibroblasts* ou CAFs) peuvent initier des programmes de sénescence qui favorisent la progression tumorale via, notamment, le dérèglement de l'autophagie, la promotion de l'inflammation et la production de métalloprotéinases favorisant la dissémination des cellules cancéreuses [466-469]. Une étude récente a démontré que l'élimination des fibroblastes avec un comportement de sénescence améliorerait les traitements de radiothérapie [470]. Bien que moins bien établis, il semble probable que d'autres cellules stromales peuplant des microenvironnements tumoraux particuliers subiront une sénescence et moduleront les caractéristiques du cancer et les phénotypes tumoraux qui en résultent [471]. L'induction de cellules endothéliales sénescents dans le MET par la thérapie peuvent accélérer la prolifération, l'invasion et les métastases dans des modèles de cancer du sein [472, 473]. Dans d'autres modèles, on a aussi montré que les cellules endothéliales sénescents peuvent contribuer à la pathogénèse. Dans le laboratoire, nous avons montré que certaines formes de rétinopathies prolifératives engendrent une vascularisation incontrôlée des vaisseaux et que les cellules endothéliales en sénescence participent à ce phénomène [442, 443].

La sénescence cellulaire peut aussi être engendrée par les traitements génotoxiques du cancer, comme la chimio- et la radiothérapie (*therapy-induced senescence*; TIS) [289]. Les conséquences du TIS dans le MET restent, encore à ce jour, dichotomique [474, 475]. D'une part, il a été mis en évidence que le SASP peut créer un environnement immunogène et que les cellules pré-malignes bénéficient d'un arrêt du cycle cellulaire [476-479] et de l'autre, qu'une signalisation prolongée du SASP peut mener à l'immunosuppression et la promotion des métastases [480-482]. De plus, bien que la sénescence ait longtemps été considéré comme irréversible, une sénescence cellulaire transitoire et réversible a été aussi décrite [483]. En effet, un groupe a récemment montré que, dans le cas de sénescence induit par les oncogènes, comme il est le cas pour l'initiation

tumorale, les cellules sénescents reprogramment les voies métaboliques du NAD pour surpasser l'arrêt du cycle cellulaire [484]. Cette publication fait suite à d'autres qui montrent que les cellules sénescents peuvent elles-mêmes ré-entrer en division et prendre part à la croissance néoplasique [365, 485-487]. Récemment, une autre étude a aussi montré que le facteur de transcription AP-1 est un régulateur central des programmes d'entrée réversible en sénescence dans un modèle d'induction oncogénique RAS-dépendant [488]. Une telle sénescence transitoire représente une forme de dormance qui complique le ciblage thérapeutique des cellules prolifératives [489]. Il existe même des preuves à l'effet que des sous-populations de cellules cancéreuses sénescents TIS peuvent acquérir des caractéristiques souches via les voies canoniques de la signalisation WNT, ce qui expliquerait qu'elles peuvent ré-entrer le cycle cellulaire et s'auto-renouveler [365]. Dans ce cas, il est documenté que les tumeurs deviennent plus agressives. En contrepartie, un groupe a montré des résultats encourageants de thérapie tirant profit de l'induction de programme de sénescence cellulaire combiné à de la chimiothérapie ou de l'ICB [490]. Ce groupe a montré que le SASP, engendré par un traitement pro-sénescents dans leur modèle (inhibiteurs de MEK et CDK4/6), a des effets sur la normalisation vasculaire et sur l'augmentation de l'immunogénicité. Un autre groupe a aussi montré que l'induction d'une TIS, via la signalisation IFN- γ /STAT1, participe à l'efficacité de l'immunothérapie en diminuant la récurrence du cancer [491].

En outre, en plus du *SASP Atlas* décrit plus haut, d'autres bases de données sont aussi disponibles gratuitement en ligne pour caractériser le potentiel de sénescence d'un échantillon comme *SeneQuest* [374], le *Human Aging Genomic Resources* [492] et le *Cancer SENESCopedia* [493]. Ce dernier outil vise à fournir de l'information sur le potentiel thérapeutique de certaines stratégies thérapeutiques avec les cellules cancéreuses comme cible première. Toutefois, du propre aveu des auteurs, un grand ensemble d'échantillons *in vivo* avec des taux élevés de sénescence sont encore nécessaire pour entraîner et valider l'outil. Un groupe a récemment publié une étude intégrative identifiant la sénescence cellulaire comme un marqueur pronostic et d'efficacité du traitement du cancer gastrique [494]. En utilisant une signature basée sur six gènes (ADH1B, IL1A, SERPINE1, SPARC, EZH2 et TNFAIP2), ils établissent ce qu'ils appellent le «*senescore*». Cette étude illustre bien la place grandissante qu'occupe la sénescence cellulaire autant sur le développement du cancer que sur la prédiction des résultats de traitements. En somme, ces données montrent bien que la recherche dans le domaine redouble d'efforts pour améliorer la caractérisation

des cellules que nous regroupons actuellement sous la bannière de la sénescence cellulaire pour arriver à tirer profit de ses vulnérabilités en contexte pathologique.

1.5.3 Opportunités thérapeutiques

Témoignant de l'effet réel des cellules sénescents sur la santé générale, il a été démontré que la transplantation de seulement 0,28% de cellules sénescents dans un tissu de façon locale ou 1 cellule sénescents sur 7 000-15 000 (0,01-0,03%) de façon systémique est suffisante pour engendrer des pertes de fonction physique chez une jeune souris [495]. L'élimination des cellules sénescents, ou l'inhibition de leurs effets, est donc une avenue thérapeutique gagnant en popularité. Comme les cellules sénescents sont importantes pour le maintien de l'homéostasie, leur élimination a le potentiel de générer des effets secondaires importants. Les avenues thérapeutiques éliminant les cellules sénescents de façon thérapeutique doivent prendre ces facteurs en considération pour raffiner cette approche. Plusieurs stratégies ont été investiguées, soit pour induire la mort (sénolyse) ou pour bloquer l'effet des cellules sénescents et limiter l'effet pathologique du SASP (sénomorphique) (**Figure 4**).

Sénolyse ciblant les régulateurs du cycle cellulaire

Tel que susmentionné, l'apoptose et la sénescence sont considérés comme étant deux mécanismes évolutifs alternatifs pour assurer le maintien de l'homéostasie tissulaire [375]. En effet, plusieurs mécanismes moléculaires pro-survie comme les voies de signalisation de p53, de la famille de protéines BCL-2, ou de la voie de signalisation PI3K/AKT sont importants pour la survie d'une cellule en sénescence [496, 497].

D'abord, l'activation de la signalisation p53/p21^{CIP} favorise l'arrêt du cycle cellulaire suite à des bris double brins de l'ADN via l'inhibition de la phosphorylation de la protéine Rb [498]. De plus, les facteurs de transcription FOXO peuvent interagir avec p53 et inhiber l'action apoptotique médiée par p53. Il a été rapporté que ces facteurs de transcription sont requis pour l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence dans ce contexte [499]. En exploitant cette liaison, un groupe a généré un isoforme D-rétro inverse de FOXO4, ce qui a eu pour conséquence d'induire une translocation de p53 au cytoplasme et la mort des cellules sénescents hautement dépendante de l'effet transcriptionnel de p53 [500]. Ceci dit, d'autres données supportent aussi le rôle de p16^{INK4a} dans le phénomène de sénescence cellulaire. D'ailleurs, on rapporte l'idée que p53/p21^{CIP} sont essentiels

pour initier l'arrêt du cycle cellulaire, alors que p16^{INK4a} serait requis pour maintenir cet arrêt et faire perdurer la sénescence cellulaire dans le temps [501, 502]. Néanmoins, on a rapporté que dans le cas de bris simple brin de l'ADN, l'arrêt p16^{INK4a}-dépendant et p53-indépendant du cycle cellulaire peut induire la sénescence [503]. Dans un modèle murin de vieillissement, l'élimination pharmacologique de cellules exprimant p16^{INK4a} réduit d'ailleurs l'incidence de la formation de masses malignes spontanées en plus d'augmenter l'espérance de vie et de retarder l'apparition de symptômes rénal ou cardiaque liés au vieillissement [504]. Plusieurs modèles murins ont été générés pour éliminer spécifiquement les cellules positives pour l'expression de p16^{INK4a}. Les souris transgéniques *INK-ATTAC* et *3MR* ont confirmées que l'élimination pharmacologique des cellules qui expriment fortement p16^{INK4a} atténue plusieurs troubles associés au vieillissement et à la sénescence dans divers tissus et organes, en plus de prolonger la durée de vie [410, 420, 504-507].

Sénolyse ciblant les protéines de la famille BCL-2

Ensuite, la voie de régulation par la famille de protéines de la famille du lymphome à cellules B-2 (BCL-2) est probablement la plus investiguée lorsqu'on parle de thérapie sénolytique [379, 508, 509]. Les médicaments ciblant les protéines de cette voie sont typiquement appelés les mimétiques de BH3 (*BCL-2 homology region 3*), ou *BH3-mimetic*, et agissent en se liant avec une haute affinité à BCL-xL, BCL-2 et BCL-w pour inhiber leur action anti-apoptotique [510]. La liaison de ces petites molécules aux protéines de la famille BCL-2 empêche leur liaison avec les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK, faisant pencher la balance des molécules pro- et anti-apoptotiques en faveur de l'apoptose cellulaire. Plusieurs pathologies comme des maladies hématologiques, auto-immunes, dégénératives et plusieurs cancers sont corrélés avec une forte augmentation de l'expression des protéines de cette famille [511]. La petite molécule appelée le Navitoclax, ou ABT-263, est l'un des premiers *BH3-mimetic* et certainement l'un des plus étudiés [508]. Bien que considéré comme un sénolytique à large spectre, des groupes ont montré des applications spécifiques de ABT-263 pour cibler des cellules sénescents comme des préadipocytes [508], des cellules spumeuses (*foam cells*) [512], des cellules souches hématopoïétiques [513], des cellules gliales [514], des ostéoprogéniteurs [515], des pneumocytes [516] et des cellules cancéreuses TIS [517]. Dans ces modèles, le traitement au Navitoclax a amélioré la santé générale des souris en diminuant l'effet de la sénescence prématurée et du SASP. L'ABT-737 et l'ABT-199, liant aussi les protéines de la famille BCL-2 avec haute affinité, ont aussi été développés

comme *BH3 mimetic* pour éliminer les cellules sénescents de l'organisme en vieillissement [518, 519]. De façon intéressante, l'ABT-199, ou venetoclax, a été le premier *BH3 mimetic* à être approuvé pour un sous-ensemble de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique ou de leucémie myéloïde aiguë [520-523]. Néanmoins, l'efficacité de ABT-199 et de d'autres *BH3 mimetic* contre les tumeurs solides est incertaine et le développement de résistance à freiner le développement de monothérapie au venetoclax [524, 525]. Les connaissances actuelles sur les inhibiteurs sénolytiques de BCL-2 dans le traitement du cancer ont prouvé qu'ils étaient dépendants de biomarqueurs putatifs [526] et du contexte [493] et principalement utilisés en thérapie combinée [428, 481, 527-531]. Plusieurs essais cliniques de phase 1 et de phase 1/2 associant des chimiothérapies induisant la sénescence et le navitoclax sont d'ailleurs en cours ou terminés. Notamment, l'ABT-263 a été associé au cocktail cisplatine et étoposide chez des patients de carcinomes pulmonaires à petites cellules (NCT00878449), à l'osimertinib chez des patients atteints de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NCT02520778) et au cocktail dabrafenib et trametinib chez des patients atteints de mélanome mutant pour BRAF (NCT01989585). L'efficacité de ces thérapies est toutefois souvent mitigée. De plus, l'utilisation clinique du ABT-263 et du ABT-199 a montré des effets secondaires, tels que la thrombocytopénie, la neutropénie [519, 532] en cas d'utilisation chronique ou de régimes à fortes doses ou même la perte potentielle d'os trabéculaire [533]. Alors que les effets secondaires peuvent être gérés par la mise en place d'une période d'arrêt temporaire de la médication, la réduction de la dose ou l'administration de G-CSF (neutropénie), des alternatives sénolytiques plus sûres et plus ciblées sont en cours de développement [519, 534, 535]. Par exemple, certains groupes ont récemment développé des versions modifiées de l'ABT-263 qui épargnent les plaquettes [536-538]. La voie est donc grande ouverte pour la génération de petites molécules sénolytique plus spécifiques pour le traitement de conditions induites par l'accumulation de cellules sénescents. D'ailleurs, des inhibiteurs de deuxième génération de la famille de protéines BCL-2 voient maintenant le jour. Des molécules comme A1331852 et A1155463 conduisent les cellules sénescents HUVEC et IMR90 en apoptose via l'inhibition spécifique de BCL-xL [539]. Ces molécules sont toutefois incapables d'induire la mort des préadipocytes humains sénescents [539]. De plus, la compagnie *Unity Biotechnology*, qui développe différentes molécules sénolytiques pour le traitement de maladies liés à l'âge, a récemment publié des résultats positifs sur son étude clinique de phase 2 concernant une de ses petites molécules inhibitrices de BCL-xL (UBX1325) pour le traitement de maladies oculaires liée

à l'âge. Ce succès en clinique fait suite à une publication de notre laboratoire montrant des effets encourageants de cette molécule chez la souris [443].

Sénolyse ciblant la voie PI3K-AKT

Puis, une autre stratégie largement utilisée pour éliminer les cellules sénescents est la combinaison de l'inhibiteur de la tyrosine kinase Dasatinib (D) et le flavonoïde Quercétine (Q) [509, 540]. L'effet combiné du Dasatinib, qui inhibe le SRC, le c-KIT, les récepteurs de l'éphrine, la voie PI3K-AKT et d'autres kinases et du Quercétine qui inhibe la voie PI3K-AKT et les protéines BCL-2 sont efficaces pour éliminer les cellules sénescents dans différents modèles chez l'homme et la souris. Par exemple, la thérapie combinée de D+Q réduit les marqueurs de sénescence et de fibrose [541, 542]. D+Q peut aussi rétablir l'homéostasie adipeuse, réduire l'hypertrophie des adipocytes et réduire l'infiltration des macrophages chez la souris, ce qui corrèle avec l'amélioration du métabolisme du glucose *in vivo* [410]. Un traitement sénolytique D+Q atténue significativement la perte de fonction physique, autant chez les souris transplantées avec des cellules sénescents que les souris âgées [495]. Les auteurs estiment que ce genre de traitement augmente même le taux de survie de 36 % et réduit le risque de mortalité à 65 %. Un essai clinique montre que des résultats encourageants qui suggèrent que ces données sont transposables chez l'humain [543]. De façon intéressante, la combinaison D+Q semble bien tolérée chez des patients humains (NCT02848131, NCT02874989, NCT02652052). Les données sont toutefois rares dans un contexte cancéreux. Un autre flavonoïde, la fisétine, a montré des effets intéressants sur la réduction de marqueurs de sénescence dans plusieurs tissus chez les souris âgées [544].

De surcroît, d'autres molécules comme la piperlongumine, un agent sénolytique naturel isolé des arbres du genre Piper [545], le panobinostat [546] et les glycosides cardiaques (CG) [547, 548] sont d'autres exemples de médicaments sénolytiques en investigation pour leur potentiel thérapeutique. Plutôt que de cibler les protéines de la famille BCL-2, la piperlongumine vise à stimuler l'apoptose via l'activation de la caspase-3, le panobinostat agit en affectant la transcription des programmes de sénescence cellulaire par son action inhibitrice des histone désacétylases, et les CG provoquent un gradient électrochimique déséquilibré dans la cellule en ciblant les pompes membranaires Na⁺/K⁺-ATPase. KU-60019, un inhibiteur d'ATM, une protéine impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, a aussi été caractérisé comme un agent anti-sénescents efficace

[549]. L'effet thérapeutique de KU-60019 a non seulement été observé *in vitro* sur des fibroblastes, mais aussi sur l'accélération de la cicatrisation cutanée chez les souris âgées en *in vivo*.

Agents sénomorphiques

Une autre approche pour limiter l'effet des cellules sénescents est l'utilisation de sénomorphiques (ou sénostatiques) qui visent à inhiber les mécanismes intracellulaires pro-sénescents en maintenant l'arrêt du cycle cellulaire et inhiber la sécrétion du SASP [550]. Tout d'abord, une caractéristique des cellules sénescents qui peut être exploitée de façon thérapeutique est leur hypermétabolisme [551]. Cette reprogrammation métabolique est consécutive de la forte demande énergétique sur les cellules sénescents, notamment pour la production du SASP. Cette demande mène à des stress protéotoxiques, oxydatifs et du réticulum endoplasmique. Ainsi, les cellules sénescents sont plus sensibles au 2-DG, un substrat ajoutant du stress sur le métabolisme glycolytique [552], et aux inhibiteurs spécifiques de V-ATPases lysosomal [553]. En lien avec le stress protéotoxique, un groupe a aussi identifié la chaperonne HSP90, via criblage basé sur l'activité SA- β -gal, comme cible potentielle pour l'élaboration de stratégies thérapeutique [554]. Une fois inhibé par 17-DMAG, cette protéine, jouant un rôle dans la stabilisation protéique, régule à la baisse la voie anti-apoptotique PI3K/AKT [555] et procure des effets cliniques notables sur le vieillissement [554]. Il est à parier que les inhibiteurs des voies de réponse au stress des protéines mal repliées ou *unfolded protein response* (UPR) puissent aussi jouer un rôle potentiellement cytotoxique sur les cellules sénescents. D'ailleurs, un article du laboratoire a montré que l'inhibition de IRE1 α , tout comme l'administration de la metformine, atténue la vascularisation pathologique dans un modèle de rétinopathie, ce qui supporte un rôle pour les effecteurs de l'UPR dans la sécrétion du SASP [441]. Ensuite, mTOR, une sérine/thréonine kinase impliquée dans une grande variété de processus cellulaires dont plusieurs mécanismes métaboliques [556], est une cible de choix pour ce genre de stratégie. En effet, la voie de mTOR, et plus spécifiquement mTORC1, contrôle le flux autophagique qui se voit diminuer dans la sénescence [557]. Le rétablissement de l'autophagie, via la rapamycine [558], est une stratégie envisageable pour diminuer le stress cellulaire sur les cellules sénescents et ralentir la dégénérescence tissulaire [559]. mTOR interagit aussi avec la voie MAPK en augmentant la traduction de MAPKAPK2 [455], entraînant finalement l'activation de NF- κ B, soit l'un des régulateurs clefs de la transcription de facteurs inflammatoires. Ainsi, l'inhibition de mTOR via la rapamycine [455, 560, 561], ou plus récemment l'évérolimus,

le temsirolimus et le déforolimus, permet de cibler les effets néfastes du SASP [562, 563]. Alors que la rapamycine permet de réduire la capacité des fibroblastes sénescents à stimuler la croissance des tumeurs de la prostate chez la souris [564], des preuves d'effets similaires sont manquants pour les autres inhibiteurs de mTOR. Les inhibiteurs de la voie MAPK, comme SB203580, UR-13756 et BIRB 796, réduisent les niveaux de plusieurs composants du SASP en impactant l'activation transcriptionnelle de NF- κ B [453, 565]. Des inhibiteurs de MAPKAPK2, soit PF-3644022 et MK2.III ont des effets similaires [565]. La modulation directe de la liaison et de l'activité de NF- κ B est aussi une stratégie exhaustivement étudiée pour réguler la transcription des facteurs du SASP. Plusieurs molécules comme Nutlin-3a, qui stabilise p53 et inhibe NF- κ B [566], le MI-63, un inhibiteur de MDM2 [567], le resvératrol [568] et les flavonoïdes (ex. wogonine, kaempférol et apigénine) [569, 570], qui interagissent avec les kinases I κ B et réduisent la génération de ROS, ou la metformine, qui réduit la translocation nucléaire de NF- κ B [571] ont tous des effets modulateurs sur la sécrétion délétère du SASP. Une étude récente montrait aussi que la metformine, par un effet sénomorphique qui inhibe la voie IL6/STAT3, augmentait l'efficacité du traitement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou en combinaison avec un inhibiteur de CDK4/6 [572]. Les auteurs montrent aussi que la sécrétion de IL6 par cette voie serait importante pour l'auto-renouvellement (*stemness*) des cellules cancéreuses sénescents. De façon intéressante, la metformine est aussi connue pour son inhibition de la voie de signalisation mTOR via l'activation de l'AMPK [573], ce qui agit de façon synergique sur l'effet anti-inflammatoire de cette drogue. Évidemment, les drogues anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes peuvent également supprimer la sécrétion de SASP en modulant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, ce qui se traduit par des effets d'inhibition de l'invasion tumorale *in vitro* [574]. En terminant, les régulateurs de l'activité C/EBP, via notamment l'inhibition de la voie JAK/STAT, par le ruxolitinib ou le tofacitinib, montrent aussi des effets sénomorphiques [575]. Une étude montre un effet prometteur du ruxolitinib sur la diminution des effets délétères d'adipocytes sénescents [421]. Pour terminer, le développement de stratégies plus spécifiques comme des anticorps monoclonaux contre un facteur du SASP pourrait avoir l'avantage de limiter les effets indésirables qu'aurait un inhibiteur d'une voie de signalisation comme mTOR, MAPK ou NF- κ B. Il reste à voir s'il s'agirait d'une stratégie efficace en contexte de sénescence pathologique. En somme, en considérant la littérature témoignant de l'hétérogénéité et du dynamisme de la sénescence cellulaire et du SASP, il faut s'attendre à ce que la recherche

translationnelle à ce sujet nous mène vers le développement de drogues plus spécifiques aux pathologies à l'étude.

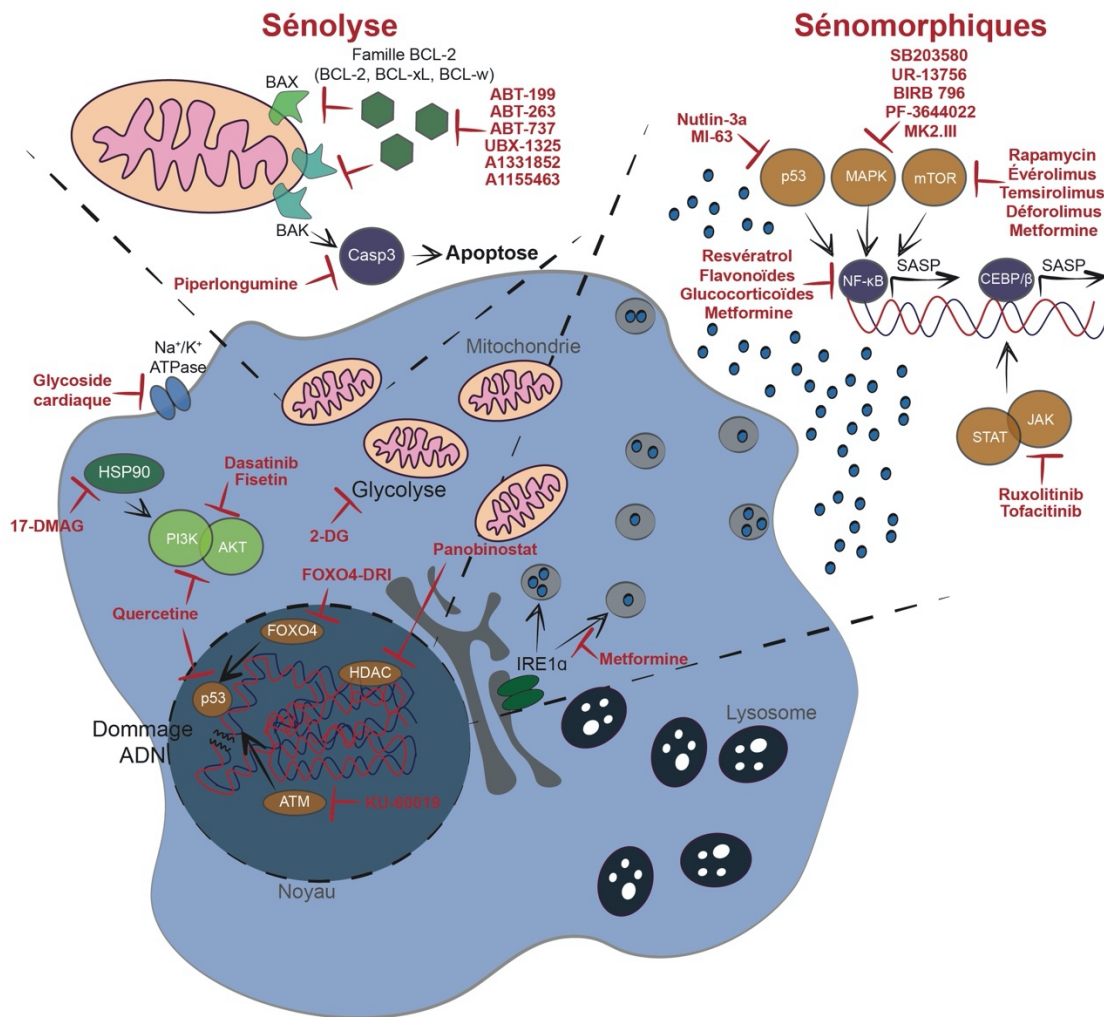


Figure 4. – Schéma récapitulatif des stratégies thérapeutiques pour bloquer les effets délétères des cellules sénescents.

Pour prévenir les effets délétères des cellules sénescents, les deux stratégies principalement mises de l'avant sont la sénolyse, soit l'élimination des cellules sénescents par apoptose, ou les stratégies sénomorphiques, soit le blocage des voies inductrices du SASP. La sénolyse vise à bloquer les voies d'adaptation métabolique empruntées par les cellules sénescents. Plusieurs petites molécules visent à bloquer l'effet anti-apoptotique des protéines de la famille BCL-2, alors que d'autres vont inhiber la signalisation PI3K/AKT, l'installation de la glycolyse, ou les voies de réponse aux dommages à l'ADN. Les sénomorphes visent plutôt à bloquer la transcription et la sécrétion des facteurs du SASP en inhibant principalement l'activation des facteurs de transcription NF-κB et CEBP/β.

1.6 TLR4 dans le cancer induit par l'obésité

1.6.1 TLR4

Les gènes codant pour les *Toll-like receptors* (TLRs) sont des homologues conservés des gènes *Toll* codant pour des récepteurs impliqués dans l'établissement de l'axe dorso-ventral durant l'embryogénèse chez la drosophile [576]. Chez l'homme et la souris, ils font partie de la grande famille des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires ou *pattern recognition receptors* (PRRs) qui assurent une réponse antimicrobienne notamment sur les cellules épithéliales, les cellules épidermiques et les muqueuses respiratoires, génito-urinaires et gastro-intestinales [577]. Les mammifères ont plusieurs classes distinctes de PRR. En plus des TLRs, il existe notamment les récepteurs de type RIG-I (RLR), les récepteurs de type Nod (NLR), les récepteurs de type AIM2 (ALR), les récepteurs de lectine de type C (CLR) et des capteurs d'ADN intracellulaires tels que cGAS [577, 578]. Les TLRs sont les premiers à avoir été identifiés, et sont les mieux caractérisés. Cette famille de récepteurs possède 13 membres connus chez la souris [579], où *Tlr10* est caractérisé comme un pseudogène [580], et 10 membres connus chez l'humain [579]. Ils ont pour rôle premier de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes ou *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) et les motifs moléculaires associés au danger ou *danger-associated molecular pattern* (DAMPs) pour assurer une réponse efficace du système immunitaire innée et adaptatif [581-583]. Cela fait de ces récepteurs des sentinelles du système immunitaire. TLR1/2/4/5/6 sont des récepteurs membranaires qui captent et reconnaissent ces antigènes [584] tandis que TLR3/7/8/9 reconnaissent les acides nucléiques étrangers et signalent intracellulairement [585]. Suite à la reconnaissance de leur ligand spécifique, chaque TLR signale via une ou plusieurs protéines adaptatrices contenant un domaine de récepteur Toll-interleukine 1 (TIR) dans le cytosol [586]. Tous les TLRs signalent via les mêmes domaines TIR, mais ce ne sont pas tous les domaines TIR qui sont utilisés par chacun des TLRs [587]. Ces domaines peuvent être divisés en 2 voies d'activation principales [588]. La première est la voie dépendante de MYD-88 qui signale via TIRAP et MYD-88. Cette voie est utilisée par TLR1/2/4/5/6/7/8/9/10 et est principalement responsable de l'activation des régulateurs transcriptionnels NF- κ B et AP-1. La deuxième voie est la voie dépendante de TRIF qui signale via TRAM et/ou TRIF et est induite après la reconnaissance du ligand de TLR3 (TRIF uniquement) et l'endocytose de TLR4 (2^e vague de signalisation). Cette activation est principalement connue pour être responsable de l'activation

des facteurs régulateurs de l'interféron tels que IRF3, mais peut également activer NF- κ B et AP-1 comme le montrent certaines études [589, 590]. Il n'est donc pas surprenant que les cellules de la lignée myéloïde soit celles qui expriment le plus les TLRs.

Néanmoins, plusieurs autres types cellulaires comme les cellules épithéliales [591], les cellules endothéliales [592], les adipocytes [593], les lymphocytes B [594] et T [595] ou même certaines lignées de cellules cancéreuses expriment un ou plusieurs TLRs [596, 597]. Les TLRs ont plusieurs rôles, mais sont plus connus pour induire le recrutement de cellules phagocytaires et de leucocytes via l'activation de voies pro-inflammatoires générant la sécrétion d'une tempête de cytokines au site touché [581]. Ils initient aussi la mort microbienne via l'induction d'iNOS, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), d'intermédiaires azotés via le complexe NADPH oxydase [597]. De plus, les TLRs peuvent participer à l'activation et la maturation des cellules B et T, pour l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative, en induisant, notamment, la sécrétion des interleukines IL-12, IL-23 et IL-27 [597]. Les TLRs peuvent aussi réguler le développement, l'expansion et la production d'anticorps des lymphocytes B [598, 599]. Les TLRs influencent également l'activité des Tregs. Des données sur l'activation de TLR4 par le LPS montrent que l'expression de ce récepteur à la surface des Tregs augmentait leur prolifération, leur survie et leur activité suppressive [600], mais d'autres TLRs peuvent aussi avoir des fonctions similaires, et parfois opposées sur l'activité suppressive de ces cellules [601, 602]. De plus, l'un des ligands connus de TIM3, un récepteur co-inhibiteur de la réponse immunitaire Th1, est HMGB1 [603]. Cette fonction partagée d'un ligand de TLR4 est un autre exemple qui met bien en évidence le fin équilibre qui existe entre l'activation du système immunitaire innée contre le non-soi et la régulation serrée pour éviter une réaction incontrôlée de ce même système. Ainsi, le rôle de ces récepteurs du système immunitaire inné peut, non seulement participer à l'établissement de la réponse adaptative, mais aussi à l'établissement de mécanismes de régulation immunitaire pouvant favoriser le développement tumoral.

Le premier homologue *Toll* découvert chez l'humain était le gène *TLR4* [604]. TLR4 est un récepteur transmembranaire contenant un domaine extracellulaire à motif répété riche en leucine, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique récepteur Toll/IL-1 [605]. Cela dit, les ligands canoniques de TLR4 se lient et signalent selon un mécanisme moléculaire qui dépend des protéines LBP, CD14 and MD-2 [606] (**Figure 5**). Il est documenté que, précédant la transduction du signal, LBP et CD14 doivent se lier au ligand et le présenter au dimère TLR4/MD-

2, ce qui conduit à leur homo-dimérisation et une signalisation en aval via la protéine adaptatrice MYD-88 [605]. Suivant le recrutement de MYD-88, le complexe nouvellement formé recrute et active à son tour, par phosphorylation, les kinases associées au récepteur de l'IL-1 (IRAK) 1 et 4. L'activation de IRAK1 par IRAK4 permet le recrutement du facteur 6 associé au TNFR (TRAF6). Le complexe nouvellement formé interagit avec le complexe formé des protéines TAK1, TAB1 et TAB2 ou TAB3, ce qui permet leur translocation au cytoplasme pour permettre la libération de NF- κ B de son complexe inhibiteur ainsi que l'activation des MAPK et de la kinase N-terminale JUN (JNK). Suivant l'activation des voies dépendantes de MYD-88, TLR4 se déplace de la membrane plasmique vers les endosomes afin de basculer vers une signalisation TRIF-dépendante [607]. À ce moment TRIF interagit avec TRAM et recrute TRAF3 aux endosomes. L'activation de TRAF3 par auto-ubiquitination conduit à la formation de complexes avec TBK1 et IKKi/IKK ϵ . Ce complexe active IRF3 et induit son homo-dimérisation ou son hétéro-dimérisation avec IRF7 pour déclencher leur translocation au noyau. La voie endosomale de TRIF peut aussi activer NF- κ B via l'action de TRAF6 et de la formation du complexe RIP1, FADD et TRADD pour son activation [608]. En somme, CREB, C/EBP β et AP-1 sont également d'importants effecteurs activés par cette signalisation [609].

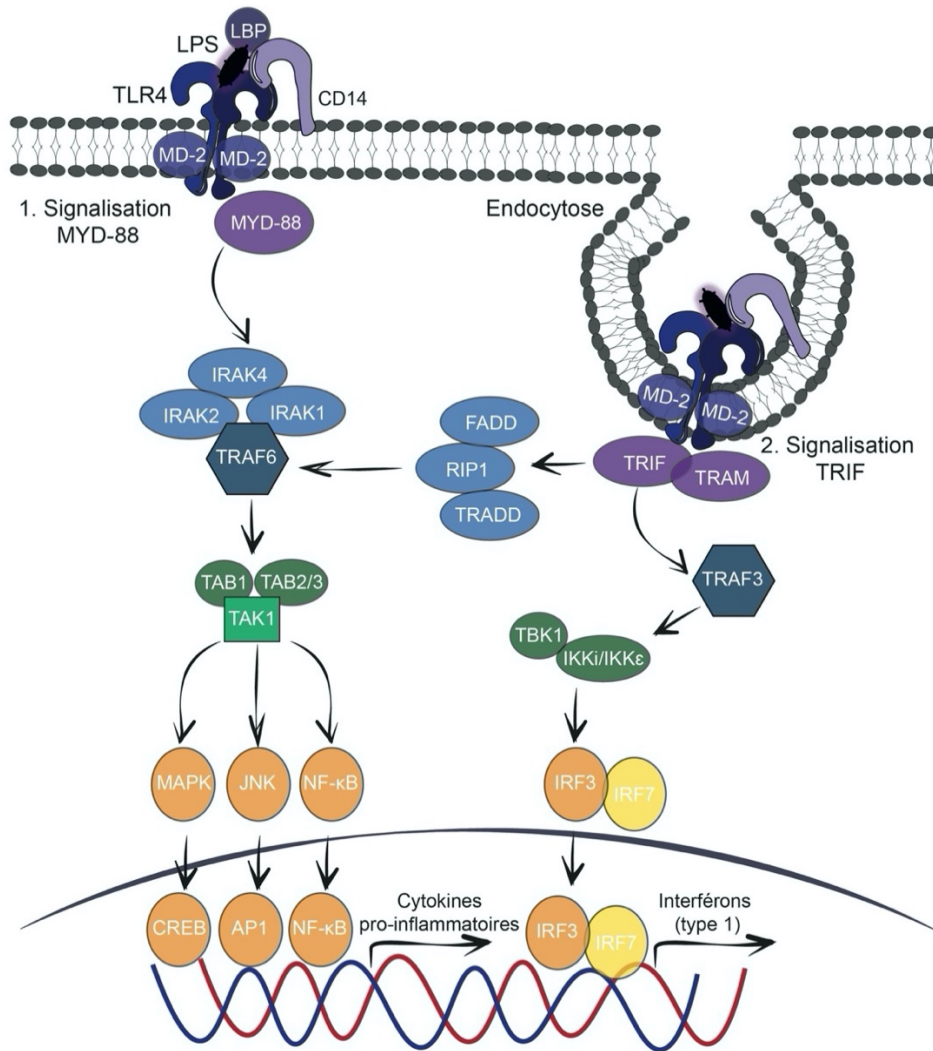


Figure 5. – Représentation schématique de la signalisation de TLR4.

Suite à la présentation du ligand par LBP et CD14, le complexe TLR4/MD-2 se dimérise et conduit à une signalisation MYD-88-dépendante suivi d’une signalisation TRIF-dépendante suivant l’endocytose du récepteur. Ces voies de signalisation mènent à la transcription de cytokines pro-inflammatoires et d’interférons de type 1 via la translocation au noyau de facteurs de transcription comme CREB, AP1, NF-κB et IRF3

L’action combinée des effecteurs de TLR4 permet d’activer plus de 1000 gènes avec la seule activation du LPS [610]. Le LPS, une composante de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, est d’ailleurs le ligand le plus connu du récepteur TLR4 [610]. Des mutations

indépendantes dans le gène TLR4 ont d'ailleurs été rapportées dans des souris hypo-sensibles au LPS (C3H/HeJ et C57BL10/ScCr) renforçant le rôle de TLR4 pour la médiation des réponses au LPS *in vivo* [611, 612]. Ceci dit, TLR4 possède plusieurs autres ligands d'origine pathogénique tels que les polymères d'acide mannuronique de bactéries à Gram-négatif [613], l'acide teichuronique de bactéries à Gram-positif [614] et des composants viraux tels que la protéine F du virus respiratoire syncytial [615, 616] et d'origine endogène tel que des alarmines et des protéines de réponse à la chaleur (*heat shock proteins* ou HSP) (ex. HMGB1, HSP70, HSP90, fibrinogène) [609, 617-619], l'hormone resistin [620], le LDL minimalement modifié (mmLDL) [621] et certains acides gras saturés de la diète [622-625]. De façon intéressante, ces activateurs de la signalisation de TLR4 peuvent aussi engendrer une réponse immunosuppressive comme c'est le cas pour HSP90 qui active pourtant les voies canoniques de TLR4 dans des macrophages [626]. De plus, plusieurs PRRs, dont TLR4, auraient un rôle à jouer dans la détection de la dyslipidémie, via la reconnaissance de lipides spécifiques, ce qui souligne le lien mécanistique entre l'obésité et l'inflammation chronique de bas grade [627]. D'ailleurs, la première preuve reliant TLR4 à l'inflammation induite par les lipides précède son identification comme récepteur du LPS [628]. De surcroît, un bon nombre de ligands et d'activateurs de TLR4, dont les lipides font partie, sont significativement augmentés de façon systémique chez un hôte en surplus de poids ou obèse et pourraient participer à l'établissement de programmes pathologiques associés à l'obésité. Ce n'est donc pas étonnant de penser que, bien que ce gène soit primordial à l'immuno-surveillance, il peut être en cause pour les troubles associés à l'inflammation chronique comme il est question dans le cancer, une dualité qui est à la base des études faites entre l'obésité et le développement de cette maladie.

1.6.2 TLR4 et obésité

Outre son rôle bien défini dans la réponse immunitaire innée, TLR4 joue un rôle moins connu, mais essentiel, dans la prise de poids. Chez l'homme, les polymorphismes rs1928295 (T>C,G; GRCh38), rs4986790 (Asp299Gly) et rs4986791 (Thr399Ile) du gène TLR4 ont notamment été rapportés pour impacter la prise de poids chez l'homme [629-631]. Bien que peu d'informations soient rapportées sur rs1928295, les mutations faux-sens rs4986790 et rs4986791 semblent mener à une hypo-réactivité aux ligands pathogéniques de TLR4 ainsi qu'à une sensibilité diminuée à de nombreuses maladies infectieuses et non infectieuses [632-635]. À l'aide d'une

modélisation protéique de TLR4 par cristallographie, un groupe a récemment généré un modèle murin d'étude de ces variants [636]. Ils montrent que les deux voies de signalisation en aval de TLR4 (MYD-88 et TRIF) sont compromises de la même manière, mais aussi que l'expression du récepteur à la membrane et sa capacité à induire la glycolyse suivant la reconnaissance d'un antigène sont aussi altérés. Ainsi, il semble que des variants impactant la fonction de TLR4 soient associés à une plus grande prise de poids. Pourtant, des résultats contradictoires ont été rapportés concernant l'impact de la délétion de TLR4 sur la prise de poids induite par un régime riche en gras chez la souris [637-641]. Il semble que le mode d'inactivation de TLR4, le type et la durée de la diète ainsi que l'âge des souris soient des facteurs importants dans ce phénotype.

Dans le cerveau, l'activation de TLR4 augmente l'expression des cytokines, le *ER stress* et la résistance à la leptine, ce qui stimule l'inflammation systémique chronique et favorise notamment l'athérosclérose et le NAFLD [637, 642, 643]. De façon importante, un groupe a aussi montré que l'activation de TLR4 sur les hépatocytes contribue à l'inflammation et à la résistance à l'insuline associées à l'obésité [644]. De plus, TLR4 est reconnu comme un TLR particulièrement important dans l'induction de l'inflammation du tissu adipeux. En effet, en plus de son impact sur la polarisation M1 des macrophages infiltrants les tissus adipeux [645, 646], il a aussi été démontré que TLR4 a un rôle à jouer dans la fibrose du tissu adipeux [647]. Néanmoins, des études utilisant un modèle de greffes de moelle osseuse pour générer des chimères TLR4 montrent des résultats contradictoires concernant le rôle de TLR4 dans les cellules hématopoïétiques sur la sensibilité à l'insuline [638, 645, 646]. Pourtant, des études montrent une relation étroite entre l'expression de TLR4 et la présence de l'insuline de façon systémique. Il semble que l'insuline ait un effet suppresseur sur l'expression de TLR4 via l'inhibition du facteur de transcription PU.1 [648]. En contrepartie, la résistance à l'insuline chez les personnes obèses augmente l'expression de TLR4 et de d'autres TLRs (TLR2/9) qui dépendent du facteur de transcription PU.1 [649, 650]. Chez l'homme, l'expression de TLR4 dans les tissus musculaires et adipeux de sujets obèses ou diabétiques (type 2) est corrélée à la résistance à l'insuline [651, 652]. Chez la souris, la lignée C3H/HeJ sur une diète riche en gras a une moins grande adiposité et une meilleure signalisation de l'insuline dans le tissu adipeux, les muscles et le foie en comparaison avec une lignée de souris avec une activation normale de TLR4 [639]. Des effets similaires sur la signalisation de l'insuline et l'inflammation des tissus ont été observés chez des souris *Tlr4^{-/-}* [653]. De surcroît, il est intéressant de remarquer une corrélation positive entre l'expression de TLR4 humain dans les

cellules mononucléaires du sang périphérique et le tissu adipeux viscéral et l'IMC, ce qui soutient son rôle dans l'obésité [654-656]. Cette association n'est toutefois pas surprenante considérant la myriade de ligands et activateurs de TLR4 qui se voient augmentés de façon importante dans un hôte en condition d'obésité. Voici une présentation des ligands/activateurs notables et leur implication dans la pathogénèse de conditions liées à l'obésité.

Obésité et ligands de TLR4

Tout d'abord, les lipides alimentaires provoquent des changements dans l'expression des TLRs [657]. Bien que l'effet de TLR4 sur la résistance à l'insuline soit controversé, l'effet de ligands de TLR4 comme les FFAs [658] et la fétuine-A [659], une glycoprotéine sécrétée principalement par le tissu adipeux et le foie qui régule négativement la signalisation de l'insuline par l'inhibition de l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline et de l'activité de la tyrosine kinase [660, 661], semblent associés aux changements dans le métabolisme du glucose médiés par l'insuline. Dans le cas des FFAs et plus spécifiquement des acides gras saturés comme l'acide palmitique et l'acide stéarique, leur présence active l'expression des facteurs de transcription inflammatoires comme NF- κ B et COX-2 et semblent induire une forte expression du facteur de chimiotaxie des macrophages MCP-1 [662, 663]. Ces actions combinées participent à l'installation d'une inflammation chronique et l'attraction des macrophages aux tissus adipeux. Il semble d'ailleurs que TLR4 soit requis dans ce phénomène [645]. De plus, il a été démontré que les acides gras saturés, en particulier l'acide laurique et le palmitate, sont capables de stimuler une réponse inflammatoire via TLR4 [664]. D'ailleurs, le palmitate, en plus d'activer les voies pro-inflammatoires JNK et de IKK- β [665], altère les voies de signalisation de l'insuline [666]. Néanmoins, un groupe a récemment montré que TLR4 ne lie pas directement le palmitate, mais qu'il active tout de même le récepteur [667]. Ainsi, le palmitate est tout de même un activateur de l'inflammation TLR4-dépendante. Selon la même étude, la signalisation activatrice par le palmitate dépendrait de l'IRE1 α et de son effecteur XBP1, une voie de la réponse aux stress du réticulum endoplasmique [668]. Comme il avait été rapporté précédemment, les auteurs montrent que le palmitate induit une reprogrammation métabolique, favorisant la glycolyse, dans les cellules du système immunitaire innée pour moduler les réponses inflammatoires pathologiques [667, 669]. De plus, il a été proposé que l'activation de TLR4 par les acides gras saturés dépende de la fétuine-A [659]. Des études épidémiologiques révèlent d'ailleurs que des niveaux systématiquement élevés

de fétuine-A sont associés à l'obésité ainsi qu'aux conditions associées au syndrome métabolique [670-676].

Ensuite, une diète riche en graisses conduit également à une activation accrue de NF- κ B, à l'expression de marqueurs d'activation comme CD11a, CD11b et CD62L à la surface des leucocytes [677] et à l'endotoxémie métabolique (forte concentration plasmatique de LPS) [678]. La dysbiose observée en obésité augmente la perméabilité intestinale, ce qui contribue grandement à cette endotoxémie. Ces études montrent aussi que cette translocation de PAMPs du lumen intestinal vers la circulation sanguine est d'ailleurs associée à une augmentation de la graisse corporelle, à une intolérance au glucose, à une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires et à une infiltration de macrophages dans le tissu adipeux. De plus, des expériences sur des souris sans germes montrent qu'une interaction entre le microbiote intestinal et les lipides saturés favorise l'inflammation du tissu adipeux viscéral indépendamment de l'adiposité et que la chimiokine CCL2 induite par le microbiote via TLR4 a un effet majeur sur ce phénotype [623]. Aussi, les acides gras polyinsaturés de la diète ont des effets atténuant la stimulation inflammatoire des acides gras saturés et des PAMPs. Ceux-ci inhibent la voie du facteur de transcription NF- κ B induite par divers agonistes [679-681]. Des études ont d'ailleurs montré que l'ingestion de suppléments d'huile de poisson réduit l'expression de COX-2 ainsi que les cytokines IL-1, IL-2 et TNF- α induit par le LPS dans les monocytes du sang périphérique [624, 682, 683]. Via la liaison au GRP120, les acides gras polyinsaturés peuvent directement interférer avec la signalisation de TLR4. De la même façon, il a récemment été rapporté que le TAK-242, un inhibiteur de TLR4 puisse améliorer les fonctions nerveuses dans un modèle d'obésité induite par la diète, ce qui illustre bien l'impact de ce récepteur sur l'inflammation pathologique en obésité [684].

En outre, la cachexie, caractérisée par une perte de poids significative, l'anorexie (perte d'appétit), l'asthénie (fatigue extrême) et l'anémie (faible niveau de globules rouges) [685], est un phénomène accompagnant souvent le diagnostic de cancers qui impacte la qualité de vie des patients et qui contribue au mauvais pronostic [685]. Dans une étude récente, un groupe montre que TLR4 joue aussi un rôle dans cette condition [686]. En effet, l'inhibition ou la délétion de TLR4 procure un effet protecteur contre la perte de poids en plus de prolonger la survie des animaux et atténuer la croissance tumorale. Ainsi, comme le suggère les variants de TLR4 présentés plus tôt et certains résultats mettant en relation l'expression de TLR4 et la prise de poids,

il semble que TLR4 puisse participer à la régulation du remodelage, autant positive que négative, des tissus adipeux en conditions pathologiques.

1.6.3 TLR4 et cancer

Les mêmes variants de TLR4 rapportés plus haut (rs4986790 et rs4986791), associés à une hypo-réactivité du récepteur à ses ligands et une plus grande prise de poids, ont aussi été récemment associés à un meilleur pronostic pour les patients adultes avec une leucémie lymphoblastique aiguë à cellules B traités à la chimiothérapie [687]. De façon intéressante, la même étude rapporte des effets similaires pour un polymorphisme commun de TLR2 (Arg753Gln ; rs5743708). Ce polymorphisme affecte l'hétéro-dimérisation avec le TLR6 et l'efficacité d'activation de ses voies de signalisation [688]. Cette étude visait pourtant à investiguer l'impact de ces polymorphismes sur la susceptibilité des patients à développer une septicémie ou une pneumonie suite à la neutropénie (mort des neutrophiles) induite par la chimiothérapie [689]. Ils ont d'ailleurs rapporté une susceptibilité pour certains de ces variants génotypiques, mais la relation entre le bon pronostic et la susceptibilité aux complications reste mal comprise. De plus, ces variants ont été associés à la prévalence de cancers gastriques induit par *Helicobacter pylori* [690]. Une mutation rare (G11481C) dans la région 3'UTR de TLR4 est aussi associée à un risque accru de développer un cancer de la prostate. D'ailleurs, il a été rapporté que l'expression de TLR4 est fortement associée à un mauvais pronostic en clinique [691]. D'autres polymorphismes de TLR4 ont récemment été rapportés pour leur impact sur le développement de cancers tels que rs10116253, rs1927911 et rs7873784 (cancers gastriques, hépatiques et du col de l'utérus) [692-695]. Par contre, il a aussi été rapporté que les polymorphismes rs10116253 et rs1927911 sont associés à une diminution du risque de cancer gastrique dans la population chinoise [696], alors que le polymorphisme rs7873784 réduit le risque de cancer gastrique chez les hommes spécifiquement dans cette même population [697]. L'impact de ces variants sur la fonction de TLR4 est mal connu.

Ceci dit, en plus de jouer un rôle dans l'obésité, TLR4 participe à la régulation des processus de tumorigénèse (développement de tumeurs) de plusieurs manières. Comme il a été mentionné précédemment, bien que l'inflammation chronique soit une caractéristique primordiale au développement de cancer, l'activation aiguë de signalisations promotrices de l'inflammation, comme TLR4, stimule des réponse antitumorales et est de plus en plus étudié pour améliorer le traitement du cancer, notamment dans le domaine de l'immunothérapie (Voir **section 1.3 Lien**

moléculaire entre cancer et obésité et 1.4 Traitement du cancer). Comme susmentionné, plusieurs études ont montré que les altérations métaboliques systémiques associées aux HFD et à l'obésité (ex. insuline/IGF, PI3K/mTORC1, etc.) coopèrent avec des altérations génétiques préalables pour promouvoir la progression de la maladie [698-702]. Néanmoins, il a aussi été montré que la DIO peut impacter la croissance tumorale de façon beaucoup plus directe. Récemment, une étude montrait qu'une telle diète pouvait augmenter la transcription de l'oncogène MYC, dans un modèle de cancer de la prostate, via la régulation de la méthylation de l'hétérochromatine dans les régions promotrices de ce gène [703]. Ce genre d'étude suggère que des ligands systématiquement augmentés par l'ingestion d'une diète riche en gras puissent participer au développement du cancer en obésité. Par exemple, une étude récente a montré que le palmitate de la diète favorise les métastases dans les carcinomes oraux et les mélanomes chez la souris, alors que d'autres acides gras comme l'acide oléique ou l'acide linoléique, aussi trouvés en grande quantité systématiquement chez un individu obèse, ne récapitulaient pas cet effet [704]. Dans un autre modèle, il a été démontré qu'une diète riche en palmitate participe au développement de cancers colorectaux (*colorectal cancer* ou CRC) via une signalisation TLR4-dépendante [705]. Dans leur paradigme d'obésité induite par la diète, des données transcriptomiques et lipidomiques montrent que TLR4 était particulièrement surexprimé et que le palmitate était particulièrement abondant dans le MET de souris obèses. Comme susmentionné, l'activation de macrophages par le palmitate semble induire des changements métaboliques via la voie IRE1 α /XBP1 en aval de TLR4 [667]. De plus, l'inhibition de la signalisation de TLR4 a montré des effets prometteurs pour le traitement du CRC [706, 707]. Ainsi, en plus de son effet sur la promotion de l'inflammation, TLR4 a été rapporté pour participer aux changements métaboliques qui profitent les cellules cancéreuses.

D'un autre côté, l'activation du récepteur TLR4 par le LPS montre aussi des effets ambivalents sur la croissance tumorale. En effet, il a été rapporté que la stimulation de cellules cancéreuses *in vitro* inhibe la croissance tumorale ultérieure *in vivo* [708]. Les auteurs ont montré que cet effet n'est pas dû à l'effet de TLR4 sur la prolifération ou l'apoptose des cellules en *in vitro*, mais plutôt à l'installation d'un environnement immuno-stimulateur en *in vivo*. La production de l'IFN γ et de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 sont fortement augmentées par les cellules cancéreuses, alors que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 diminue dans ce modèle. Ces données vont de pair avec la littérature récente suggérant l'effet synergique de ligands

de TLR4 pour l'amélioration de traitements d'immunothérapie (Voir **section 1.3 Lien moléculaire entre cancer et obésité** et **1.4 Traitement du cancer**). Néanmoins, il a été rapporté que la stimulation des cellules cancéreuses de la prostate au LPS peut aussi enclencher la production de facteurs immunosuppresseurs et pro-angiogéniques comme le TGF- β et le VEGF [604]. Récemment, l'inhibition de la liaison du LPS à son récepteur a aussi montré des effets prometteurs sur la prévention de métastases de cancers gastriques [709]. Comme susmentionné, d'autres études montrent l'interdépendance entre l'immunité et le microbiome et leur rôle sur l'inflammation et le cancer [Voir **section 1.3 Lien moléculaire entre cancer et obésité**]. Par exemple, la production d'acide déoxycholique (DCA) dans le cancer du foie (*hepatocellular carcinoma* ou HCC) est associé à la prévalence du phylum *Firmicutes* dans l'obésité ainsi que la sécrétion du SASP dans ce modèle [710]. L'augmentation de PAMPs en circulation semble jouer un rôle majeur dans la promotion de carcinome hépatique, bien que ce phénotype ne semble pas requérir TLR4. Pourtant, dans un modèle similaire d'induction de carcinome hépatique, un autre groupe a rapporté que, bien que TLR4 et le microbiote intestinal ne soient pas nécessaires pour l'initiation de HCC, ils sont requis pour sa promotion, soit le développement de tumeurs déjà formées [111]. En plus des effets immunosuppresseurs de TLR4 sur les lymphocytes comme susmentionné, il a aussi été rapporté que la stimulation de TLR4 par le LPS sur les cellules cancéreuses peuvent entraîner une augmentation de la production d'IL6 et d'iNOS pour affecter négativement la fonction des lymphocytes T cytotoxiques [711] et entraîner la suppression des cellules NK et des cellules T [712]. En effet, la signalisation de TLR4 a aussi été attribuée à la fonction des cellules MDSC [713, 714], entre autre via l'activation par HMGB1 [715], une protéine de type alarmine hautement sécrétée lors d'un dommage tissulaire ou de l'obésité [716, 717], ce qui participe à l'établissement de cet environnement immunosuppresseur. De surcroît, HMGB1, lorsque libéré lors de l'apoptose, peut participer aux fonctions de tolérance immunitaire bénéfique aux cellules tumorales [618] et la résistine semble aussi pouvoir favoriser la progression du cancer du sein via TLR4/NF- κ B/STAT3 [173]. Pourtant, il a aussi été démontré que, dans un modèle de croissance tumorale faiblement immunogène (LLC), la libération des chimiokines CCL2, CCL5 et CCL10 a un effet antitumoral dépendant de HSP70 et TLR4 suite à un traitement l'hyperthermie locale [718]. Ainsi, ce type de traitements permet d'augmenter l'immunogénicité de tumeurs visibles via TLR4.

De façon intéressante, il semble que l'expression de TLR4 sur les cellules cancéreuses elles-mêmes puisse également réguler la réponse immunitaire, ce qui met l'accent sur l'importance des

cellules malignes dans l'établissement d'un environnement immunosuppresseur. L'expression de TGF- β induite par TLR4 a également été associée à une plus grande prolifération des cellules cancéreuses et la croissance tumorale via l'action des CAFs [719]. Aussi, il a été montré que le TGF- β et le VEGF-A, sécrétés par les cellules tumorales, pourraient induire des agonistes endogènes du TLR4, S100A8 et S100A9, et donc aussi agir en amont pour assurer une boucle de rétroaction protumorale et pro-métastatique [720]. De surcroît, d'autres facteurs de croissance comme l'EGFR [721-727], le PDGF [728-730] et le HGF, via l'expression de HIF1 α [731] et HSP-70 [732], sont également connus pour être réciproquement connectés avec TLR4 dans divers types de tumeurs solides, ce qui conduit à la prolifération, la survie cellulaire et aux métastases des cellules cancéreuses dans plusieurs modèles.

En outre, en plus d'initier la transcription de cytokines et chimiokines suite à son activation, TLR4 peut être activé par certains de ses facteurs inflammatoires. Par exemple, CXCR7 déclenche la prolifération et la migration cellulaire dans les cancers gastriques et colorectaux via TLR4 [733, 734]. Pour mettre en évidence l'effet dichotomique de TLR4 sur la croissance tumorale, le traitement des cellules avec CXC195 a montré une réponse antiproliférative dans le carcinome hépatocellulaire [735] et l'activation de TLR4 par PAI-1 induit l'expression des chimiokines anti-inflammatoires CCL-17 et CCL-22 et de TGF- β par IL-6 [736]. En contrepartie, comme susmentionné, IL-6 et PAI-1 sont deux protéines associées à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers (Voir **section 1.3 Lien moléculaire entre cancer et obésité**). Pris ensemble, ces données indiquent que non seulement l'identité de la cellule exprimant TLR4 (cellule cancéreuses, cellules myéloïdes, lymphocytes T et B, etc.), mais le ligand et la durée de l'activation du récepteur ont aussi leur importance sur le résultat de la signalisation de TLR4 sur le développement tumoral. De façon générale, une activation aiguë de la signalisation de TLR4 déclenche une réaction inflammatoire qui augmente l'immunogénicité tumorale alors que son activation prolongée sur les cellules immunitaires ou cancéreuses semble créer un environnement immunosuppresseur qui protège le néoplasme. On peut imaginer que l'épuisement du système immunitaire observé dans ce contexte, semblable à l'installation de l'immunosénescence précédemment décrite (Voir **section 1.5 Sénescence cellulaire**), sert d'abord à protéger l'hôte des effets néfastes d'une activation prolongée de l'inflammation, ce qui bénéficie aux cancers.

1.6.4 TLR4 et sénescence cellulaire

Le lien entre TLR4 et la sénescence cellulaire est peu documenté, mais quelques études suggèrent que l'activation de ce récepteur puisse induire un effet pro-sénescence. Par exemple, un groupe a montré des effets importants de la délétion de TLR4 dans les cellules hématopoïétiques sur la santé métabolique chez la souris nourrie avec une diète riche en gras [638]. Cette étude, parue avant la découverte fondamentale selon laquelle la sénescence cellulaire des cellules hématopoïétiques était associée au vieillissement à plusieurs dysfonctions métaboliques [513], permet de tisser des liens entre les symptômes causés par la sénescence cellulaire lors du vieillissement et l'expression de TLR4 en obésité. De plus, HMGB1 est aussi impliqué dans l'installation de la sénescence et la sécrétion du SASP, via notamment, la signalisation de TLR4 [737]. D'autres activateurs de TLR4, comme le palmitate [738] ou le LPS [739-741], qui sont trouvés en haute concentration dans un hôte en surplus de poids, peuvent induire de la sénescence cellulaire *in vitro*. Sans explorer la sénescence cellulaire, le groupe montrant que le palmitate puisse activer TLR4 sans liaison directe [667] montre que les macrophages activés par le palmitate présentaient une reprogrammation métabolique via IRE1 α et mTOR, qui se sont révélés être des moteurs importants de la sécrétion d'un SASP dans les cellules sénescences (Voir **section 1.5 Sénescence cellulaire**). De plus, TLR4 a aussi été lié à la sénescence cellulaire suite à une réponse aux dommages à l'ADN [742, 743] ou à une activation soutenue de TLR4 dans les cellules souches de la pulpe dentaire. [744]. Un groupe a récemment montré que la voie non-canonique de reconnaissance cytoplasmique du LPS peut aussi induire un phénotype ressemblant à de la sénescence via la caspase 4 [745]. Toutefois, des évidences *in vivo* sont manquantes à ce sujet et ne suggèrent pas toujours un lien clair. Par exemple, bien que l'obésité augmente la perméabilité intestinale [109], et qu'une dysbiose puisse induire la sécrétion d'un SASP protumoral dans un modèle de carcinome hépatique, il n'est pas clair si TLR4 et le LPS sont importants dans ce processus [710]. En outre, des résultats préliminaires du laboratoire suggèrent tout de même que l'activation chronique de TLR4, via des injections répétées de LPS (4 fois), puisse engendrer un phénotype semblable à la sénescence cellulaire *in vivo* [Fournier, Hata *et al*, en cours]. Dans cette même étude, nous avons produits des résultats suggérant que l'activation aiguë du système immunitaire, via une injection unique de LPS, n'est toutefois pas suffisante pour générer un phénotype de sénescence. De façon intéressante, notre modèle d'inflammation chronique augmente la croissance de tumeurs syngéniques alors que notre modèle d'inflammation aiguë la réduit. Ces

données expliquent en partie comment TLR4 puisse avoir des effets dichotomiques sur le développement de pathologies associées à l'obésité et pourquoi son activation peut être exploitée dans le développement de thérapies visant à augmenter l'immunogénicité (Voir **section 1.4 Traitement du cancer**).

Chapitre 2 Hypothèses, objectifs et approches expérimentales

2.1 Problématique et hypothèses de recherche

Comme l'âge, l'obésité fait partie des facteurs de risque contribuant au développement de plusieurs cancers [16-20]. Certaines associations moléculaires ont été décrites et investiguées pour tenter d'expliquer comment l'obésité peut avoir un effet aussi profond sur le développement de cette maladie. Néanmoins, ce lien reste incomplet et le développement de stratégie thérapeutique exploitant les liens moléculaires entre l'obésité et le cancer méritent plus d'attention. L'inflammation chronique accompagnée, notamment, par l'infiltration de cellules myéloïdes dans les tissus adipeux en expansion est une cause moléculaire qui est connue pour jouer un rôle pivot sur la progression tumorale en obésité [40]. D'ailleurs, le concept d'immunosénescence, se définissant par le déclin de l'efficacité de la réponse immunitaire, souvent accompagné par une inflammation chronique de faible grade, ou *inflammaging*, est un phénomène encore mal compris, mais qui pourrait participer au vieillissement immunitaire prématuré comme celui qui est observé en obésité [391, 400]. Ainsi, non seulement a-t-il été montré que la sénescence cellulaire participe à plusieurs conditions liées à l'obésité et à la prise de poids elle-même [393, 417, 434], mais la sénescence cellulaire et, en parallèle, l'établissement d'un environnement immunosuppresseur, sont d'importants facteurs participant à la tumorigénèse [7]. En prenant en compte les dynamiques complexes de la sénescence cellulaire et de la sécrétion d'un SASP, reposant autant sur les caractéristiques cellulaires intrinsèques que sur le déclencheur de la sénescence [446-448], nous émettons l'hypothèse que **l'obésité puisse être un inducteur de sénescence dans le cancer qu'il est possible d'exploiter, via une stratégie sénolytique, pour ralentir ou même bloquer le développement de tumeurs.**

De plus, nos recherches nous ont mené à investiguer, au niveau mécanistique, comment l'obésité peut induire la sénescence cellulaire dans le MET et accentuer la croissance tumorale. Nos recherches se sont concentrées sur l'implication du récepteur TLR4. TLR4, qui a un rôle central dans la réponse immunitaire innée [605] via sa forte expression à la surface des cellules myéloïdes [605], a aussi la capacité d'influencer la prise de poids [629, 631]. De plus, il semble être fortement exprimé durant l'obésité [654] en conséquence de la présence abondante de plusieurs de ces ligands et activateurs comme le LPS [610] et les acides gras saturés [622]. De façon intéressante, notre laboratoire a rapporté une forte expression de TLR4 sur des coupes de tumeurs métastatiques (CRC) de patients obèses (IMC>35) non-répondant aux traitements, alors que les patients maigres (IMC <25) ne montraient que peu d'expression (Voir **chapitre 3 – article 2**). Cette trouvaille met d'ailleurs en lumière la vaste littérature ambivalente sur l'implication de la signalisation TLR4 dans le développement de plusieurs cancers [45-52]. Il semble que l'activation aigüe de ce récepteur ait un effet globalement antitumoral et immunostimulant, alors que son activation chronique mène, globalement, à une tolérance immunitaire, semblable à l'immunosénescence, et un effet protumoral. Bien que l'obésité soit une condition qui augmente l'abondance de ses activateurs, le rôle du TLR4 sur la croissance tumorale dans un contexte d'adiposité ou d'obésité reste mal compris. Dans ce projet, nous avons émis l'hypothèse que **le récepteur TLR4 joue un rôle important dans l'établissement d'un microenvironnement tumoral qui favorise la sénescence cellulaire et la croissance tumorale de souris en surplus de poids**. Dans cette étude, nous visons à élucider un mécanisme moléculaire par lequel les tumeurs peuvent profiter de la sénescence cellulaire pour croître rapidement.

2.2 Objectifs

Afin de répondre à nos hypothèses de recherche, les objectifs de recherche sont les suivants : (1) Investiguer la présence et l'origine de cellules sénescents dans le MET d'hôtes sur une diète riche en gras, (2) évaluer l'impact de la sénolyse sur le développement de tumeurs induites par l'obésité, (3) analyser l'impact de l'expression de TLR4 sur le développement de tumeurs induites par l'obésité et (4) investiguer le mécanisme par lequel TLR4 puisse accélérer le développement de tumeurs et l'induction de la sénescence tumorale dans un modèle d'obésité.

2.3 Approches expérimentales

Pour adresser ces objectifs de recherche, nous avons utilisé un modèle d'obésité induit par la diète (*Diet-induced obesity* ou DIO). Notre paradigme expérimental *in vivo* combine ce modèle DIO avec un modèle d'injections syngéniques de différentes lignées cancéreuses occasionnant différentes réponses immunogéniques, soit les cellules de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC) faiblement immunogènes, les cellules de mélanome (B16-F10) modérément immunogènes ou les cellules d'adénocarcinome du côlon (MC-38) hautement immunogènes [314-316]. Le suivi du volume tumoral s'est fait par imagerie *in vivo* et par mesure directe avec un pied-à-coulisse. De plus, l'identification de cellules avec forte activité SA- β -gal a été permise avec la cytométrie en flux, grâce à l'adaptation et l'optimisation d'un protocole publié [746] pour générer un nouveau protocole qui utilise le substrat C₁₂FDG de la β -galactosidase *ex vivo*.

Objectifs 1-2 : Pour adresser les deux premiers objectifs, nous avons opté pour le paradigme expérimental *in vivo* susmentionné dans la lignée de souris C57Bl/6J. Pour induire la mort des cellules sénescentes en *in vivo*, nous avons utilisé l'ABT-263. Notre protocole de cytométrie en flux permettant l'identification de cellules SA- β -gal⁺ a été utilisé en combinaison avec des techniques de biologie moléculaire (Western blot, qPCR, immunofluorescence, FACS) pour identifier les cellules sénescentes dans le MET et vérifier leur élimination suite à la sénolyse.

Objectifs 3-4 : Pour adresser les deux derniers objectifs, nous avons employé le paradigme expérimental *in vivo* susmentionné dans une lignée de souris n'exprimant pas le gène *Tlr4* (*Tlr4*^{-/-}) et leur contrôle (C57Bl/6J). Nous avons effectué une l'analyse transcriptomique (RNAseq) des cellules myéloïdes associées aux tumeurs. De plus, notre protocole de cytométrie en flux pour l'identification de cellules SA- β -gal⁺ a été utilisée en combinaison avec Western blot, qPCR, immunofluorescence, FACS, pour investiguer la présence de cellules sénescentes dans les tumeurs de souris en surplus de poids. Comme nos résultats ayant identifiaient IRE1 α comme jouant un rôle important dans notre phénotype, nous avons utilisé des souris n'exprimant pas le gène *Ern1* (IRE1 α) dans les cellules myéloïdes spécifiquement (*Ern1*^{Lys^{-/-}}) et leur contrôle (*LysMCre*) pour vérifier l'impact de l'expression de IRE1 α dans les cellules myéloïdes sur la croissance tumorale en obésité.

Chapitre 3

Article1: Obesity triggers tumoral senescence and renders poorly immunogenic malignancies amenable to senolysis

Article sous presse dans Proceedings of the National Academy of Sciences

Authors: Frédéric Fournier¹, Roberto Diaz-Marin¹, Frédérique Pilon², Mathieu Neault¹, Rachel Juneau², Gabrielle Girouard³, Ariel M. Wilson², Bruno Larrivée², Frédérick A. Mallette^{1,4}, Sergio Crespo-Garcia^{1*}, Przemyslaw Sapieha^{1,2*}

Affiliations:

¹Department of Biochemistry, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

²Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

³Department of Biomedical Sciences, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

⁴Department of Medicine, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Université de Montréal, H1T 2M4, Canada

*Corresponding authors

Contact: Przemyslaw (Mike) Sapieha, Ph.D.
E-mail: mike.sapieha@umontreal.ca

or Sergio Crespo-Garcia, Ph.D.
E-mail: sergio.crespo.garcia@umontreal.ca

Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre
5415 Assumption Boulevard, Montreal,
QC, H1T 2M4, Canada.
TEL: (514) 252-3400 ext. 7711. FAX: (514) 252-3430

ABSTRACT

Obesity is a major risk factor for cancer. Conventional thought suggests that elevated adiposity predisposes to heightened inflammatory stress and potentiates tumor growth, yet underlying mechanisms remain ill-defined. Here, we show that tumors from patients with a body mass index (BMI) >35 carry a high burden of senescent cells. In mouse xenograft models, we correlated a pronounced accretion of senescent cancer cells with poorly immunogenic tumors when mice were subjected to diet-induced obesity (DIO). Treatment with the senolytic BH3 mimetic small molecule inhibitor ABT-263 selectively stalled tumor growth in mice with DIO to rates comparable to regular diet-fed mice. Thus, consideration of body adiposity in the selection of cancer therapy may be a critical determinant for disease outcome in poorly immunogenic malignancies.

Keywords

Obesity; Cancer; Cellular senescence; Senolysis, Immunogenicity

Significance Statement

Obesity is a major modifiable risk factor for cancer yet the mechanisms by which high adiposity drives tumor growth remain poorly understood. Here we found that tumors from patients with a body mass index (BMI) >35 carry a high burden of cells that have entered a state called senescence. While classically associated with organismal and cellular aging, cellular senescence can also be triggered by cellular damage and damage to the cell's DNA. Senescent cells produce a broad secretome of inflammatory factors that, when persistent, may itself exacerbate tissue damage and accelerate tumor growth. We found that when tumors are poorly immunogenic in obese mice, they grow rapidly and have high numbers of senescent cells. Targeting these tumors in obese mice with a senolytic drug (drug that kills senescent cells) stalls tumor growth to rates comparable to lean mice. Our findings suggest that a patient's body adiposity should be considered when selecting cancer therapies.

INTRODUCTION

Obesity constitutes a major modifiable risk factor for cancer. Worldwide, around 12% of cancers in men and 13% of cancers in women are estimated to be attributable to obesity [1]. In the USA, it is believed that 20% of all cancer-related deaths in women and 14% in men over the age of 50 correlate with being overweight or obese [2]. These numbers will continue to rise as developed and developing countries see steep increases in populational rates of obesity [3]. Despite extensive research efforts, the cellular and molecular mechanisms by which tumor growth is triggered and driven by obesity remains poorly understood but several lines of evidence point to elevated systemic inflammation and cytokine levels [1, 4-8].

A potential contribution to the elevated production of inflammatory factors in obesity may come from cells that have entered a senescent state [9-12]. Ageing and obesity accelerate the accumulation of senescent cells in several organs and tissues contributing to deleterious changes in body weight and composition, cardiac and metabolic health, insulin resistance as well as hepatic steatosis [13-15]. Cellular senescence is associated with growth arrest in mitotic cells and often interchangeably associated with aging, yet can be triggered in younger organisms secondary to cellular, DNA and organelle damage (reviewed in [16]). It is involved in physiological development [17, 18] and wound healing [19], but can conversely exacerbate several ageing-associated diseases such as retinopathies [20-22] and cancer [23, 24]. High adiposity is reported to accelerate phenotypes associated with ageing, promote cellular senescence, and provoke a state of cytokine production called the senescence associated secretory phenotype (SASP) [25-30]. Cellular growth arrest that leads to senescence is thought to have evolved as a protective mechanism to limit tumor growth. However, if sustained, senescent cells within the tumor may accelerate cancer cell proliferation through SASP-induced inflammation and epithelial to mesenchymal transition [16, 31-33]. Senescent cells become reliant on pro-survival pathways such as those regulated by the B-cell lymphoma protein-2 (BCL-2) family [34-38]. Members of this family such as BCL-2, BCL-xL, BCL-w and MCL1 inhibit the pro-apoptotic action of BAX or BAK through direct binding [39]. Hence, while originally developed for use in oncology, BCL-2 family inhibitors or BH3-(BCL-2 homology region 3) mimetics can be used to steer senescent cells down an apoptotic path. For example, drugs such as navitoclax (ABT-263) which binds BCL-2, BCL-xL, and BCL-w, have shown promising preclinical results through their senolytic activity in

mitigating several age-related pathologies and conditions associated with cellular damage [21, 40-42]. However, there has been limited success for ABT-263 in oncology, due to potential side effects [43-45] and limited single agent efficacy [46]. Consequently, it is mainly used in combination therapy in oncology [12, 47-52], potentially because the senolytic activity of small molecule BCL-2 inhibitors is dependent on the stressors that instigated senescence [53].

In the current study, we observed that obese patients with colorectal cancer (CRC) metastasis in the liver and who were unresponsive to treatment had a significant number of senescent cells associated with malignant regions. We developed a senescence-associated (SA)- β -galactosidase single-cell detection assay that allowed us to correlate elevated burden of senescent cancer cells to poorly immunogenic tumors in xenograft mouse models. We demonstrate that diet-induced obesity (DIO) is a trigger for cellular senescence in rapidly forming and poorly immunogenic tumors. Using ABT-263 as a proof of concept of senolysis, we targeted senescent cancer cells and stalled tumor growth to rates seen in lean mice. Our data provide rationale for pharmacological intervention using targeted senolysis for tumors in individuals with elevated BMIs.

RESULTS

Diet-induced obesity potentiates tumor growth and triggers tumoral senescence in poorly immunogenic tumors

Obesity can impair immune function, impacting the strength of tumoral immunity and potentially yielding a tumoral microenvironment (TME) permissive for cancer cell proliferation [30, 54]. Obesity can also alter TME metabolism to suppress anti-tumor immunity [55]. Reduced immunogenicity and an immunosuppressive TME are both characteristics of poorly immunogenic tumors. Senescent cells, usually cleared by Natural Killer cells, macrophages, neutrophils, and T cells, survive and accumulate in poorly immunogenic tumors because of suboptimal immune surveillance [20, 56].

In order to investigate the link between adiposity and senescence in poorly immunogenic tumors, we assessed the senescence burden in human histological samples from obese patients (BMI>35) with CRC. In hepatic metastasis biopsies of these patients, we found elevated expression of the cell cycle arrest marker p16^{INK4A} and the SASP protein PAI-1 when compared to samples from lean patients (BMI<25) (**Figure 1A**). Notably, p16^{INK4A}-positive cells were ~4-fold more

abundant in tumoral regions than in healthy hepatic regions of obese patients (**Figure 1B**; **Supplementary Figure S1A-B**). Dashed lines delimit between healthy (H) and tumoral (T) tissues. Biopsies from lean patients did not show any difference in expression of p16^{INK4A} between tumoral and healthy regions, suggesting that p16^{INK4A} expression in tumors was driven by elevated BMI.

To explore the consequences of cellular senescence on tumor growth during obesity we modeled the paradigm with xenografts in mice undergoing diet-induced obesity (DIO). We randomized male *C57Bl/6J* mice to either ad libitum high-fat diets (60% fat calories) or nutritionally-matched control chow diets (10% fat calories). After 1 month of diet, the feeding paradigms lead to mice with significant differences in weight (**Supplementary Figure S1C**) and glucose metabolism as evaluated by glucose tolerance test (GTT) (**Supplementary Figure S1D**) and insulin tolerance test (ITT) (**Supplementary Figure S1E**). Subsequently, obese mice were inoculated with syngeneic tumor models from cancer cell lines presenting different levels of immunogenicity: poorly immunogenic Lewis lung carcinoma cells (LLC), mildly immunogenic melanoma cells (B16-F10), or highly immunogenic colon adenocarcinoma cells (MC38) (**Figure 1C-E**; **Supplementary Figure S1F**) [57-59]. Consistent with the notion that obesity potentiates cancer development, we observed significantly augmented tumor growth during DIO starting on the 1st week after inoculation for all cancer cell lines.

Next, we characterized the presence of senescent cells in each of the three syngeneic tumor lines. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity was robustly increased in LLC tumors of DIO-mice (**Figure 1F**) and to a lesser extent in B16-F10 tumor xenografts in high fat diet fed mice (**Figure 1G**). Conversely, MC38 tumors, which are the most immunogenic, did not show SA- β -gal activity (**Figure 1H**). In addition, Western blot analysis revealed that tumors from LLC xenografts also showed a high fat diet-dependent increase in senescence markers PAI-1, BCL-xL, BCL-2, and p16^{INK4a}. In contrast, these markers did not vary in tumors from either B16-F10, or MC-38 cell lines (**Figure 1I**). Moreover, the transcription of several SASP-related factors such as *Il6*, *Vegfa*, *Tgfb*, and *Nos2* was significantly increased in LLC tumors from DIO-mice (**Figure 1J**). Collectively, our data suggest an inverse correlation between tumoral senescence and tumoral immunogenicity.

Therapeutic senolysis with ABT-263 hinders obesity-driven tumor growth uniquely in poorly immunogenic tumors

Given elevated levels of BCL-2 family proteins in LLC tumors after DIO (**Figure 1**), we next sought to determine the therapeutic merit of senolysis for poorly immunogenic LLC tumors during obesity. We opted to target senescent cells with the small molecule BCL-2/BCL-xL/BCL-w inhibitor ABT-263 [34, 37]. While ABT-263 is toxic toward platelets and neutrophils [43, 60], and has limited single agent use in clinic, we used the compound to establish a proof-of-concept for senescence in obesity-driven tumor growth. We treated mice with DIO by gavage for 5 consecutive days with either ABT-263 (75mg/kg) or DMSO vehicle, starting 7 days post tumor inoculation and measured tumor growth by caliper volumetric measurements (**Figure 2A**).

ABT-263 significantly reduced the size of poorly immunogenic LLC tumors in mice with DIO within 14 days, but had no effect on the growth of immunogenic MC-38 tumors (**Figure 2B-C**). We next evaluated the specificity of senolysis by measuring SA- β gal activity with an adapted protocol [61] using the 5-Dodecanoylamino fluorescein di- β -D-galactopyranoside (C₁₂FDG) substrate for β -galactosidase *in vivo* (**Supplementary Figure S2A**). In mice inoculated with LLC cells, tumors had ~22% of C₁₂FDG⁺ cells, but these cells were obliterated by ~2 fold after ABT-263 treatment (**Figure 2D-F; Supplementary Figure S2B**). Conversely, highly immunogenic MC-38 tumors were largely irresponsive to ABT-263 treatment, with tumors containing only ~2-3% of C₁₂FDG⁺ prior and after treatment (**Figure 2G-I; Supplementary Figure S2C**). Together, these results highlight different response rates to a BCL-2/BCL-xL/BCL-w inhibitor in poorly immunogenic tumors, with elevated senescent cell burden (22,2% to 13,3%), versus highly immunogenic tumors with low numbers of senescent cells (2,9% to 2,0%) (**Figure 2J**).

ABT-263 selectively targets SA- β -gal⁺ cancer cells in mice with DIO and stalls tumor growth

To identify the cell population that are targeted by ABT-263, we transduced the LLC cell line with mCherry and luciferase reporters (LLC^{mCherryLuc}) to allow *in vivo* tumor monitoring and complementary *ex vivo* analyses (**Supplementary Figure S3A-B**). The stability of the transgene, as well as its impact on proliferation and viability of LLC cells was verified (**Supplementary Figure S3C-D**), confirming that tumor phenotypes and growth rates were maintained when on DIO (**Figure 1,2 & Supplementary Figure S3E- F**).

As above (**Figure 2**), *in vivo* imaging of tumors in mice with DIO revealed that ABT-263 significantly decreased the growth rate of tumors from LLC^{mCherryLuc} cells to rates observed in non-obese control (CTRL) mice (**Figure 3A-B**). Also, ABT-263 did not reduce tumor growth or presence of C₁₂FDG⁺ cells in CTRL mice which further highlights its specificity for mice with DIO (**Supplementary Figure S3G**).

To assess the impact of ABT-263 on distinct cell populations within the tumor, we performed FACS analysis in naive and C₁₂FDG-labelled tumours to determine the identity of senescent cells that were being eliminated. We gated on tumor-associated macrophages (TAMs) (Zombie⁻, CD45.2⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻, CD11c^{-/low} (to discriminate DCs), F4/80^{high}, CD64⁺), tumor-associated neutrophils (TANs) (Zombie⁻, CD45.2⁺, CD11b⁺, Ly-6G^{high}) and tumor-associated endothelial cells (TAECs) (Zombie⁻, CD45.2⁻, CD31⁺). ABT-263 did not reduce numbers of total or C₁₂FDG⁺ TAMs (**Figure 3C-F**; **Supplementary Figure S3H**), total or C₁₂FDG⁺ TANs (**Figure 3G-J**; **Supplementary Figure S3I**) nor total or C₁₂FDG⁺ TAECs (**Figure 3K-N**; **Supplementary Figure S3J**). Importantly, ABT-263 selectively eliminated mCherry⁺ cancer cells and mCherry⁺ C₁₂FDG⁺ cells by ~35% compared to DMSO control (**Figure 3O-R**; **Supplementary Figure S3K**). These data suggest that, in obesity, C₁₂FDG⁺ cancer cells of poorly immunogenic tumors are selectively susceptible to therapeutic elimination through inhibition of BCL-2 family members.

ABT-263 impedes accumulation of growth-arrested cancer cells in poorly immunogenic tumors with DIO

In an effort to confirm if C₁₂FDG⁺ LLC cells were in a state of cellular senescence, we assessed cell cycle status of viable cancer cells within implanted tumors (**Supplementary Figure S4A**). Following treatment with ABT-263, the number of LLC cells in G0/G1 phases was significantly decreased (DMSO: 21.75%; ABT-263: 12.64%), and compensated by an increase in cells in G2/M phases (DMSO: 72.16%; ABT-263: 80.56%) (**Figure 3S-T**). These data are consistent with accretion of senescent cancer cell during DIO, where C₁₂FDG⁺ LLC cells undergo cell cycle arrest in the G0/G1 phase (**Figure 3U**). In sum, targeting BCL-2 family members with ABT-263 in senescent cancer cells therapeutically impedes obesity-driven tumor growth in poorly immunogenic tumors (**Figure 4A**).

DISCUSSION

Epidemiological studies have established an association between adiposity and cancer [2, 62], yet biological links remain elusive. In this study, we explored the possibility that high adiposity could trigger tumoral cell senescence and foment tumor growth. We provide evidence that p16^{INK4a}-positive cells trend with proliferative lesions in obese patients with hepatic metastasis of colorectal cancer, that mice on HFD see exacerbated growth of tumors associated with heightened senescence burden in poorly immunogenic tumors, and that senolysis with a BH-3 mimetic can revert tumor growth in obese mice to rates observed in lean mice. Collectively, these data suggest that a patient's body adiposity should be considered in the selection of cancer therapy and may be an important determinant for disease outcome.

Senescent cells accumulate in several organs during obesity, leading to fat accumulation, metabolic consequences, or even anxiety and neurogenesis [14, 15, 27, 63, 64]. Here we found that obese patients with hepatic metastasis of colorectal cancer displayed high levels of p16^{INK4a}-positive cells within tumors and highly associated with proliferative lesions. Although p16^{INK4a} plays a pivotal role in dictating a protective cellular senescence, it can also be an indicator of unfavorable prognostic for a number of advanced stage malignancies [65, 66], in part due to the SASP that can fuel cancer development and growth (reviewed in [16, 51]). During the metastatic phase of gastric cancer, which is characterized by poor treatment response, cancer cells acquire epithelial-to-mesenchymal-transition properties through processes that have been associated with cellular senescence [67]. Interestingly, we observed an inverse correlation between accretion of senescent cells and tumor immunogenicity profiles across various tumor cell lines. Within the timeframe of our experimental paradigm, low immunogenic LLC and mildly immunogenic B16-F10 tumors had higher burdens of senescence cells, while highly immunogenic MC38 tumors were devoid of senescent cells. Diet-induced obesity has been shown to accelerate tumor growth in mice by influencing the TME and immune response by impairing infiltration and function of CD8⁺ T in highly immunogenic tumors such as MC38-derived [55]. Our data provides additional evidence that tumoral senescence can further influence tumor development in poorly immunogenic tumors. Future investigations should determine if HFDs themselves trigger cellular senescence in cancer cells, provides a TME that is conducive for induction of cellular senescence or accelerates cancer cell proliferation that triggers pathways of cellular senescence.

In obese mice, senolytic drugs can improve metabolic health [27, 68] and reduce hepatic steatosis [15]. With the current study, we demonstrate that ABT-263, a broad inhibitor of pro-survival BCL-2 family members BCL-2/BCL-xL/BCL-w, can be used as a senolytic drug to limit the rapid tumor growth observed with DIO in poorly immunogenic tumors that are rich in senescent cells. ABT-263 is orally bioavailable and the first to enter phase I clinical trials for Non-Hodgkin Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia [69, 70]. Responses to the drug were partial with little progression-free survival. Clinical development of ABT-263 was limited by side effects such as thrombocytopenia and neutropenia with repeat use or high dose regimens [43, 60] due to inhibition of BCL-xL. While side effects can be managed through the implementation of a lead-in period, dose reduction or the administration of GCSF (neutropenia) [60, 70, 71], safer and more targeted BH3-mimetics such as ABT-199 (Venetoclax) that spare BCL-xL have been developed [39]. With this study, we provide a proof-of-concept that BH3-mimetics may be used as senolytics for stalling cancer growth of tumors that have an elevated burden of senescent cells such as that observed in poorly immunogenic tumors upon DIO.

In sum, our data suggest that the pro-tumoral effects of obesity occur, at least in part, via elevated burden of tumoral cellular senescence. Collectively, our findings suggest that senolytic therapies, such as those based on BH3 mimetics, may be beneficial for tumors when patients have an elevated BMI and that body composition may be a factor to consider in selection of cancer therapy.

MATERIAL AND METHODS

Histological preparation of human CRC metastasis in liver biopsies: Histological human samples were obtained from the RRCancer Biobank (CRCHUM) through a collaboration with the investigator in charge, Dr. Simon Turcotte. The use of the histological samples was approved by the CÉR-CEMTEL committee (Protocol 2022-2647), and no other information than the one presented in Table S1 was provided. Lean (BMI<25) and obese (BMI>35) patient samples were embedded in paraffin, cut at 5µm and kept at room temperature in a locked cabinet. Samples preparation went as followed. Slides were heated on a thermo-block for 5min at 100°C before being deparaffinized in xylenes solution. Samples were then hydrated and boiled for 10min in a citrate buffer to optimize antigen retrieval.

Immunofluorescent detection in human biopsies: Immunodetection was performed following a blocking and permeabilization step with BSA 3% and Triton-X-100 0.1% during 30 min. Antibodies were incubated in blocking solution overnight and were detected using specie-appropriate fluorescent-conjugated secondary antibodies. Samples were then mounted and visualized using an epifluorescence microscope (Zeiss Axio Imager).

The number of p16^{INK4a}-positive cells (ab241543) were determined using the colocalization finder plugin on ImageJ. p16^{INK4a} and DAPI colocalized stainings were assessed using Pearson's correlation measurements in healthy and tumoral regions independently (2 representative regions per sample). All analyzed regions represented 5x5-tiled images using a 10X objective to cover representative areas in biopsies.

Animal models: All animal studies complied with the ARRIVE Guidelines 2.0 (detailed ARRIVE Guidelines in the Supplementary Material file) [72]. *C57BL/6J* WT mice were purchased from the Jackson Laboratory and bred in house. All strains were bred in the institute's animal facility and kept in 12h-12h light and dark cycles with free access to water and food. Animals were assigned to the different experimental groups in a randomized fashion.

Diet-induced obesity (DIO) model: One month prior to tumor inoculation, all 8-week- old animals were randomly subjected to either a high fat diet (60% lipids) or a nutritionally matched CTRL diet (10% lipids)). Both diets were purchased from Research Diet. Animals were left on

diet until sacrifice (14 weeks of age). Animal weights were monitored weekly throughout the duration of the experiment using a digital balance.

Glucose Tolerance Test: Mice were starved for 12 hours overnight. Blood glucose was measured from the tail vein using AlphaTrak2 test strips before intraperitoneal injection of 10% D-Glucose in PBS (2 mg/kg of weight) and at 15, 30, 60, 120 and 240 minutes after.

Insulin Tolerance Test: Mice were starved for 6 hours in the morning. Blood glucose was measured from the tail vein using AlphaTrak2 test strips before intraperitoneal injection of insulin (0.75 U/kg of weight) and at 30, 60 and 120 minutes after.

Syngeneic tumor inoculation and volumetric monitoring: To initiate tumors, we inoculated cancer cells in 12 weeks old animals by subcutaneously injecting 4×10^5 LLC cells, 5×10^5 B16-F10 cells or 5×10^5 MC-38 cells in 100 μ L of PBS 1X. These cells are from *C57BL/6J* origin, which has the advantage of being immunologically compatible with our mice strain. Tumor growth was followed at different time-points by means of caliper for volumetric measures (7, 10, 12, and 14 days after inoculation) *in vivo*. Tumor volume was calculated with the following formula: volume = (length \times width²)/2. Mice reaching predetermined endpoints such as a tumor volume reaching 500 mm³ or a significant tumor ulceration or weight loss (>20%) were euthanized and excluded from further analysis. At the endpoint of experiments, tissues of interest were collected and processed for further analysis.

Generation of transgenic LLC^{LUC-mCherry} and *in vivo* luciferase activity monitoring: Murine LLC cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin–streptomycin. A transgene was generated via the retroviral infection of the MSCV-LUC-IRES-mCherry plasmid (referred in this paper as LLC^{LUC-mCherry}) as described before [73]. In brief, to generate ecotropic retroviral particles, pCL-ECO and MSCV-Luciferase-IRES-mCherry vectors were co- transfected at a 1:1 ratio. Transfections of plasmid DNA in HEK293T cells were performed using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. For transduction, virion supernatants and fresh LLC culture media were mixed with a 1:1 ratio and supplemented with 6 μ g/mL of hexadimethrine bromide. LLC cells were seeded at a rate of 1 million cells/mL in transduction media and spun at 900 g (2250 RPM, Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor A-4-81 MTP/Flex) for 90 min at 24°C. Two days following

transduction, mCherry-expressing cells were sorted by FACS (BD FACSAria II Flow Cytometer) (Supplementary Figure S3A). Luciferase activity of these cells was also confirmed using an IVIS (Supplementary Figure S3B). The expression of mCherry was maintained after 3 passages of the infected LLC cells (88,3% positive) demonstrating the stability of its expression over time (Supplementary Figure S3C). We also showed that the cell cycle status (PI) and BrdU incorporation were not affected by the transduction, ensuring that LLC^{LUC-mCherry} cells had a similar proliferative rate to the uninfected LLC cells (Supplementary Figure S3D). Luciferase assays were performed following manufacturer's recommendations. In brief, 150mg of D-Luciferine potassium salt per kg of animal was intra-peritoneally (IP) injected 10 minutes prior to the imaging using an *In Vivo Imaging System* (IVIS; IVIS Lumina). Animals were kept anaesthetized while imaging. Luciferase activity was analyzed according to radiance (photon/second/cm²/steradian). Tumor growth was followed at different time-points by means of luciferase assay (3, 5, 7, 10, 12, and 14 days after inoculation). This strategy allowed us to monitor tumor growth using the luciferase activity of the LLC cells in *C57Bl/6J* mice.

Histological analysis of senescence-associated β -Galactosidase activity in tumors: SA- β -gal activity assays were carried out as previously described [74]. 20 μ m tissue sections were incubated in a PBS1X-MgCl₂, pH5.0 buffer overnight at 4°C. The buffer was replaced by an X-Gal staining solution (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- galactopyranoside) (1 mg/mL X-Gal, 1mM MgCl₂, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆) in PBS 1X, pH5.0 for 6 hours at 37°C. All tumor cross-sections were assessed at the same time. The reaction was stopped with 4 washes of PBS1X and imaged immediately using an epifluorescence microscope (DIC; Zeiss Axio Imager).

Immunoblotting: Protein extraction from tumors was performed with 100-500 mg of frozen tissues (-80°C). Tissue was homogenized in lysis buffer (150mM NaCl, 1%NP40, 0,5%DOC, 50mM Tris pH8.9) followed by the addition of the 2X detergent buffer (150mM NaCl, 2%NP40, 1%DOC, 0,2% SDS, 50mM Tris pH8.9) to the samples. Both buffers were supplemented with phosphatase (1:100) and protease (1:500) inhibitors. Protein extraction was also performed on cell-sorted cells. Using a FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences) device, we were able to extract CD45.2⁺CD11b⁺Ly6G⁻CD11c^{low}F4/80^{high}CD64⁺ cells (TAMs) and mCherry⁺ cells (cancer cells). The extraction method consists, this time, of cell lysis in RIPA 1X buffer (150mM NaCl, 1%NP40, 0,5%DOC, 0,1% SDS, 50mM Tris pH8.9), supplemented with phosphatase and protease

inhibitors, followed by a freeze and thaw cycle. Protein concentration from homogenate and cell lysates was assessed using a QuantiPro BCA Assay Kit and wanted amount of protein (10-50µg) was analyzed for each condition by standard SDS- PAGE technique. All primary antibodies are listed in Supplementary Table S2.

Western blots quantification was all carried the same way. We quantified western blots images using the ImageJ software (Mean gray area) for each analyzed protein. Firstly, every sample on a particular membrane was normalized to its own reference protein signal (β -actin). Secondly, the normalized signal was rationalized on the mean of all the normalized signals of the experimental control. Every replicate (n) is presented as a relative signal to the mean of the experimental control signals of the same experiment.

Quantitative PCR analysis of tumor lysates: RNA extraction was performed with 100 to 500mg of frozen tissues (-80°C) after the TRIzol Reagent Protocol. 1 µg of RNA was then reverse-transcribed according to the manufacturer's instructions (Applied Biological Materials Inc.). The qPCR experiments were performed using BrightGreen 2X, 250nM of primer mix (1:1), and 40ng of complementary DNA per reaction (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Expression levels of *Actb* were used to normalize the expression of the different genes. All primers used are listed in Supplementary Table S3.

Senolysis treatment *in vivo* after tumor inoculation: To investigate the relevance of senescent cells in tumors and their impact on tumor growth, we treated mice with navitoclax (ABT-263), a senolytic targeting BCL-2 family members and inhibiting their anti-apoptotic action [34, 71], via gavage. Following the same *in vivo* experimental paradigm as before, we treated DIO-WT and CTRL-WT mice for 5 consecutive days, starting on the 7th day post-inoculation, with either ABT-263 (75mg/kg) or vehicle (DMSO) resuspended in corn oil via gavage. Mice were randomly assigned to receive either the compound or the vehicle prior to tumor inoculation. As before, tumors were monitored every second day for two weeks by means of luciferase activity and caliper measurements and mice reaching the predetermined endpoints were euthanized and excluded from further analysis. At the endpoint of experiments, tumors were collected and processed for FACS analysis.

Tumor microenvironment characterization with FACS: Tumors were collected in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and homogenized in a solution of 500U/mL Collagenase IV,

10 μ g/mL Liberase TL and 100U/mL DNase I for 30 minutes at 37°C with gentle shaking every 5 minutes. Homogenates were then filtered with a 70- μ m-cell strainer and washed in PBS supplemented with 10% FBS. Samples were then subjected to 1X RBC Lysis Buffer for 5 minutes and the remaining cells were resuspended in PBS for zombie aqua viability staining for 15 minutes at room temperature. Cell suspensions were then incubated with LEAF purified anti-mouse CD16/32 for 10 minutes at 4°C to block Fc receptors. Cells were then incubated for 25 minutes at 4°C with wanted mixes of the following antibodies (all detailed in Supplementary Table S3): Alexa Fluor® 700 anti-mouse CD45.2, Brilliant Violet 711TM anti-mouse/human CD11b, PE/CY7 anti-mouse F4/80, APC/CY7 anti-mouse Ly6G, Brilliant Violet 785TM anti-mouse CD11c, APC anti-mouse CD64, APC anti-mouse CD31. Macrophages, neutrophils, and endothelial cells were gated as: Macrophages (Zombie⁻, CD45.2⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻, CD11c^{-low} (to discriminate DCs), F4/80^{high}, CD64⁺), Neutrophils (Zombie⁻, CD45.2⁺, CD11b⁺, Ly-6G^{high}) and endothelial cells (Zombie⁻, CD45.2⁻, CD31⁺). In addition, cancer cells (LLC cells) were detected by their endogenous mCherry expression (mCherry⁺ cells). FACS was performed on a Fortessa X20 device with Diva software and data were analyzed using FlowJo Software.

Single-cell analysis of senescence-associated β -Galactosidase activity in tumors: The *in vitro* protocol for the detection of SA- β -gal⁺ cells using 5- Dodecanoylamino fluorescein di- β -D-Galactopyranoside (C₁₂FDG) published in Nature Protocol [61] was adapted for the single cell detection of SA- β -gal⁺ cells in our *in vivo* settings. We dissected and homogenized tumors as mentioned above and used the same gating strategies as before to identify macrophages, neutrophils, endothelial cells, and cancer cells. Then, we increased the internal pH of lysosomes to an expected pH5 using bafilomycin A1. Following an hour incubation of 100 μ M bafilomycin A1 (37°C; 5% CO₂), 2 μ M of C₁₂FDG, a β -galactosidase substrate emitting green fluorescence upon enzymatic reaction, was added to the sample for 20 minutes (37°C; 5% CO₂), rendering the detection of SA- β -gal⁺ cells possible by flow cytometry on a Fortessa X20 (BD Biosciences) device. Data were further analyzed using the FlowJo software.

Cell cycle analysis in tumors: We dissected and homogenized tumors as mentioned above. Then, we analyzed the cycle state of cancer cells (mCherry⁺) using DAPI (75 μ M) as previously described (G0/G1=2n, S=2n~4n, and G2/M=4n) [75]. Samples were permeabilized and fixed following the manufacturer's instructions (Cytotfix/Cytoperm kit). The day of the acquisition at the Fortessa X20

device (BD Biosciences), we thawed cells and performed the DAPI staining right before the FACS acquisition.

Material and Data Availability: All materials as well as data used in this project are referenced in the Supplementary Table S4. Further information and requests for resources, reagents, materials, or data should be directed upon reasonable request to the corresponding author, Przemyslaw Sapieha (mike.sapieha@umontreal.ca).

Statistical analysis: All experiments were performed at least 2-3 times. Data are presented as mean \pm SEM. P values were considered significant when $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) or $p < 0,001$ (***). All outliers are determined with the ROUT method (Q=1,0%). The number of minimum biological replicates (n) for consistent results was established based on previous experiments and existing literature references. At least 3 biological replicates were used for each biochemical experiment (*ex vivo*, *in vitro*), whereas 4 to 17 biological replicates per group were used for animal studies (*in vivo*). *N* are indicated in figure legends for each experiment.

Study approval: All studies were approved by the Animal Care Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center in agreement with the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FF, SC-G and PS conceived and designed the experiments. FF, SC-G and RD-M conducted the animal experiments. FF, FP, and RJ conducted the FACS experiments. MN designed and produced the LLC^{LUC-mCherry} cell line. FF, SC-G, GG, AMW, FAM, BL and PS provided significant input and wrote the manuscript. FF and SC-G designed the figures. All co-authors reviewed the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

PS holds the Wolfe Professorship in Translational Research and a Canada Research Chair in Retinal Cell Biology. FAM is the recipient of the Canada Research Chair in Epigenetics of Aging and Cancer. This work was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (Foundation grant #148460), Heart and Stroke Foundation (G-21-0031875), and the Canadian Diabetes Association (DI-3-18-5444- PS). SC-G: Holds a scholarship from the Fonds de

la Recherche du Québec en Santé (FRQS) and from the Montreal Diabetes Research Center (MDRC). MN: holds post- doctoral fellowships from the FRQS and the Cole Foundation. RD-M: Holds a scholarship from Le Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal (FROUM). We thank Dr Simon Turcotte and Mme Louise Rousseau for providing human samples through the RRCancer biobank, Dr Mikhail Sergeev for support with microscope, Dr Claire Viillard for teaching the xenograph model, Dr Christopher Rudd laboratory at CRHMR for kindly providing MC-38 and B16-F10 cancer cell lines, Vera Guber, Dr Gaëlle Mawambo, and Dr Natalija Popovic for their technical support and the animal facility assistants for managing the colony at the Hospital Maisonneuve- Rosemont Research Center.

FOOTNOTES

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest

FIGURES

Figure 1

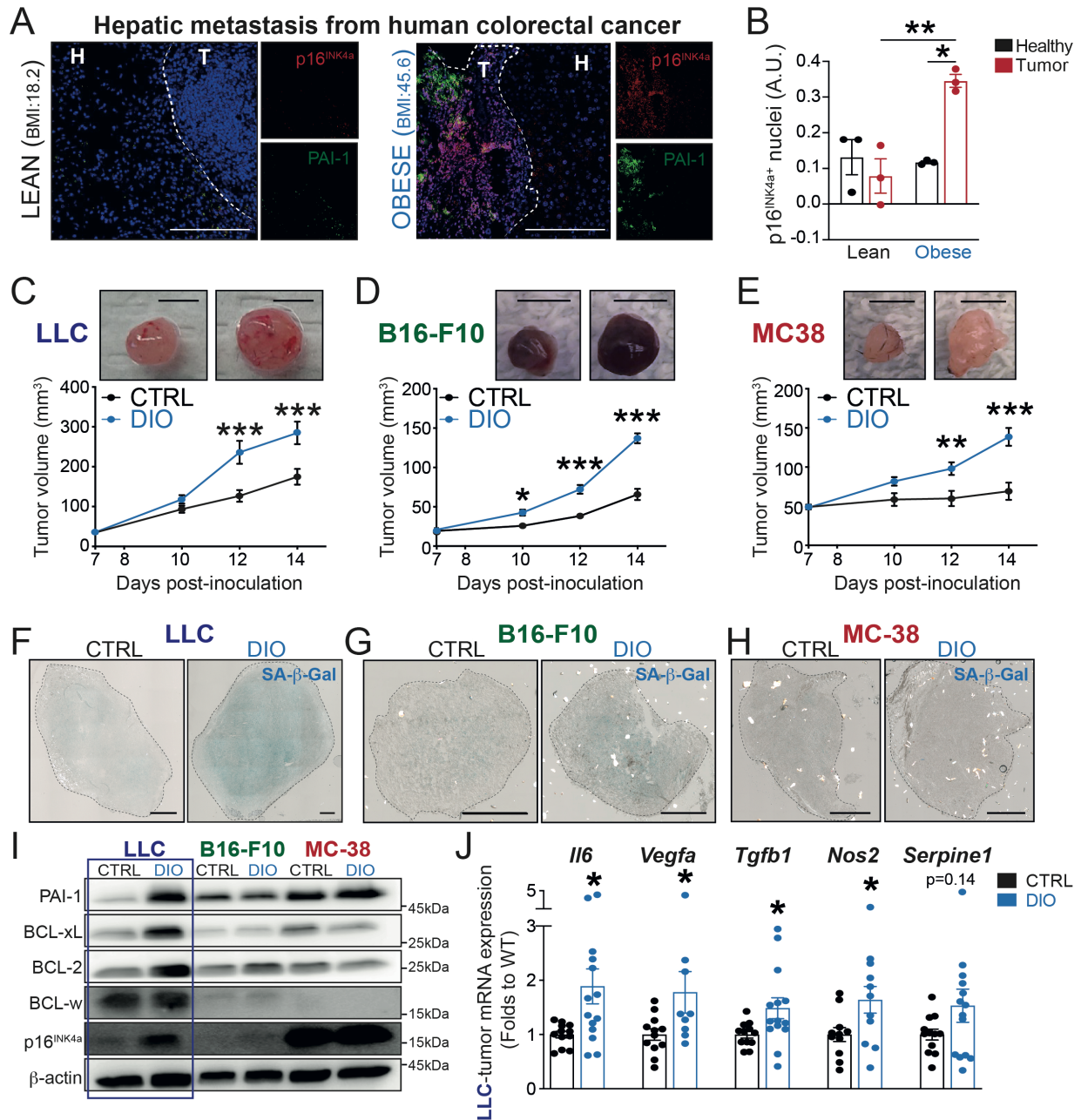


Figure 6. – Article 1 - Figure 1. Diet-induced obesity potentiates tumor growth and triggers tumoral senescence in poorly immunogenic tumors

Representative immunofluorescence images showing p16^{INK4a} (in red), PAI-1 (in green), and merged images with DAPI (in blue) in lean and obese patients. Dashed lines delimit between

healthy (H) and tumoral (T) tissues (Scale bar = 200 μ m). **B.** Bar charts represent colocalization analysis between p16^{INK4a} and DAPI within healthy and tumoral regions using person's correlation. **(C-E)** Volumetric analysis of tumor growth, using caliper, of mice under DIO and CTRL-fed mice in the time-course after **(C)** LLC, **(D)** B16-F10, or **(E)** MC-38 inoculation at 7, 10, 12 and 14 days (Scale bar = 5mm). **(F-H)** Representative images of senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -Gal) on **(F)** LLC, **(G)** B16-F10, or **(H)** MC-38 tumor cross sections (Scale bar = 1000 μ m). **(I)** Representative images of PAI-1, BCL-xL, BCL-2, BCL-w, and p16^{INK4a} protein expression in whole LLC, B16-F10, and MC-38 tumors of mice under DIO and CTRL-fed mice. **(J)** Bar charts represent analysis of SASP-related factors using mRNA expression of *Il6*, *Vegfa*, *Tgfb1*, *Nos2*, and *Serpine1* in whole LLC-tumor lysates.

Human data represent 3 independent samples. WB data represent n \geq 3 from independent experiments.

Statistics: **(B)** One-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test **(C-E)** Two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. **(J)** Two-tailed unpaired Student's *t* test. * P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001; 95% CI. Error bars represent mean \pm SEM. Each *n* represents biological replicates.

Figure 2

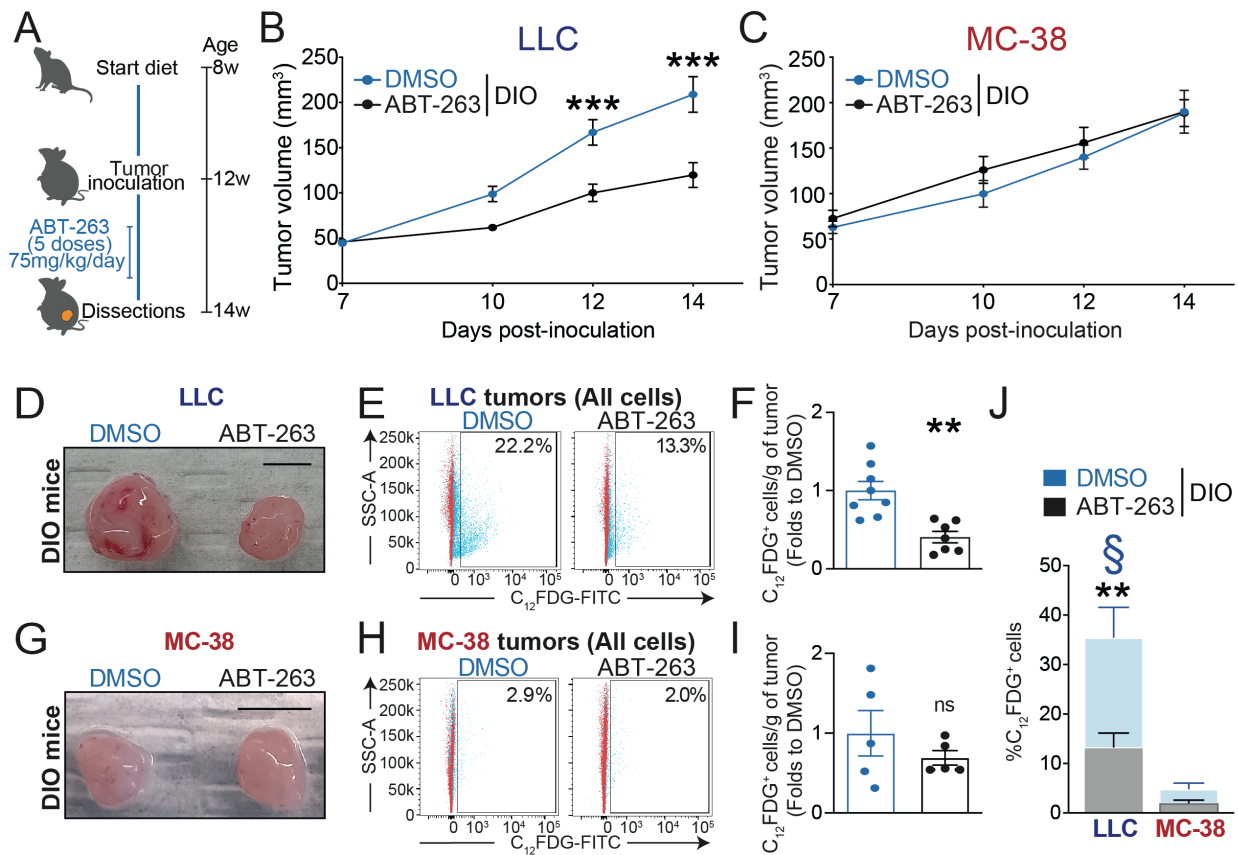


Figure 7. – Article 1 - Figure 2. Therapeutic senolysis hinders obesity-driven tumor growth

(A) Schematic representation of the experimental paradigm combining diet-induced obesity with ABT-263 treatment. (B-C) Curve represents tumor growth *in vivo* using caliper volumetric measurements of (B) LLC or (C) MC-38 cells. (D-I) Representative images, FACS histograms and quantification of C₁₂FDG⁺ cells in (D-F) LLC tumors or (G-I) MC-38 tumors from DMSO- or ABT-treated mice. Percentages indicate proportion of C₁₂FDG⁺ cells in tumors. Bar charts indicate the relative number of C₁₂FDG⁺ cells per gram of tumor. (J) Bar charts indicate the relative proportion of C₁₂FDG⁺ cells in LLC or MC-38 tumors after treatment or controls. § compares DMSO groups and * compares ABT-263 groups.

Tumor monitoring and FACS data represent ≥2 independent experiments with n≥5 biological replicates.

Statistics: **(B-C)** Two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. **(F,I-J)** Two-tailed unpaired Student's *t* test. * or § P < 0.05, ** or §§ P < 0.01, ***P or §§§ < 0.001; 95% CI. Error bars represent mean ± SEM. Each *n* represents biological replicates.

Figure 3

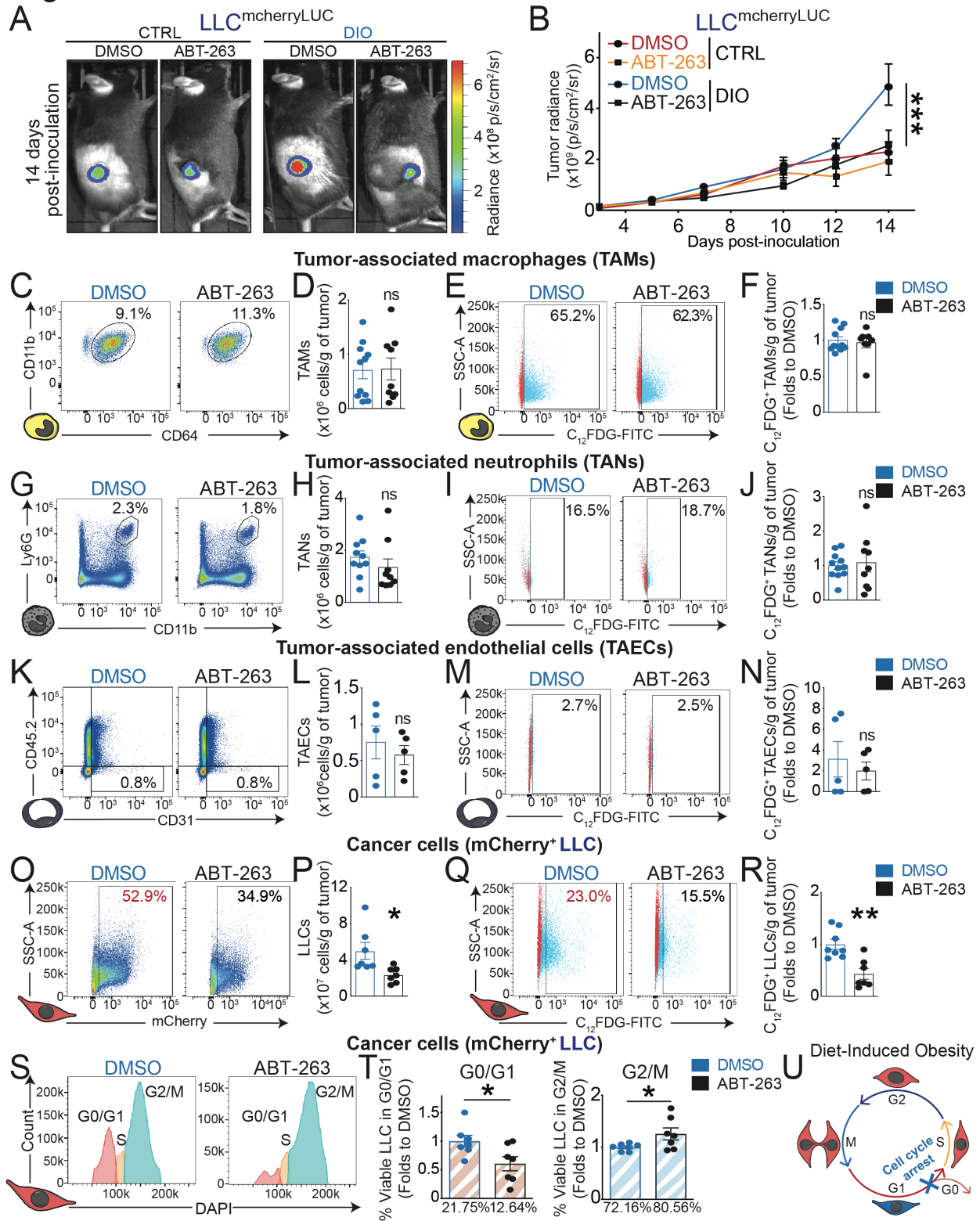


Figure 8. – Article 1 - Figure 3. ABT-263 targets growth arrested SA- β gal⁺ cancer cells in obese mice and limits tumor growth

(A) Representative images of tumors *in vivo* from ABT-263-treated and control mice at 14-days post-inoculation of LLC cells obtained with *IVIS*. Images overlay the luminescent signals and are represented as radiance (p/s/cm²/sr). Imaging thresholds were optimized for minimizing inter-batch variation (min: 4.00e7; max:6.90e8). (B) Curve represents tumor growth *in vivo* using luciferase activity by means of *IVIS*. (C-R) Representative FACS histograms and quantification of (C-D) total and (E-F) C₁₂FDG⁺ TAMs, or (G-H) total and (I-J) C₁₂FDG⁺ TANs, or (K-L) total and (M-N) C₁₂FDG⁺ TAECs, or (O-P) total and (Q-R) C₁₂FDG⁺ LLC cells in the TME. Percentages indicate proportion of tumor-associated TAMs, TANs, TAECs or cancer cells to viable cells. Bar charts indicate the absolute number of cells from a given cell type per gram of tumor or the relative number of C₁₂FDG⁺ cells from a given cell type per gram of tumor. (S) Representative histograms depicting the cell cycle state of LLC cells within the TME. (T) Cell cycle analysis by FACS, represented as fold change to DMSO control in cancer cells at either the G0/G1 phase, or the G2/M phases. Percentages indicate proportions of LLC cells in the G0/G1 or the G2/M phase to total LLC cells. (U) Schematic representation of the cell cycle arrest of a C₁₂FDG⁺ LLC cell in the G1 phase

Tumor monitoring data represent ≥ 2 independent experiments with $n \geq 4$ biological replicates. FACS data represent ≥ 3 independent experiments with ≥ 5 biological replicates.

Statistics: (B) Two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. (D,F,H,J,L,N,P,R,U) Two-tailed unpaired Student's *t* test. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001; 95% CI. Outliers were determined with the ROUT method (Q=1,0%). Error bars represent mean \pm SEM. Each *n* represents biological replicates.

Figure 4

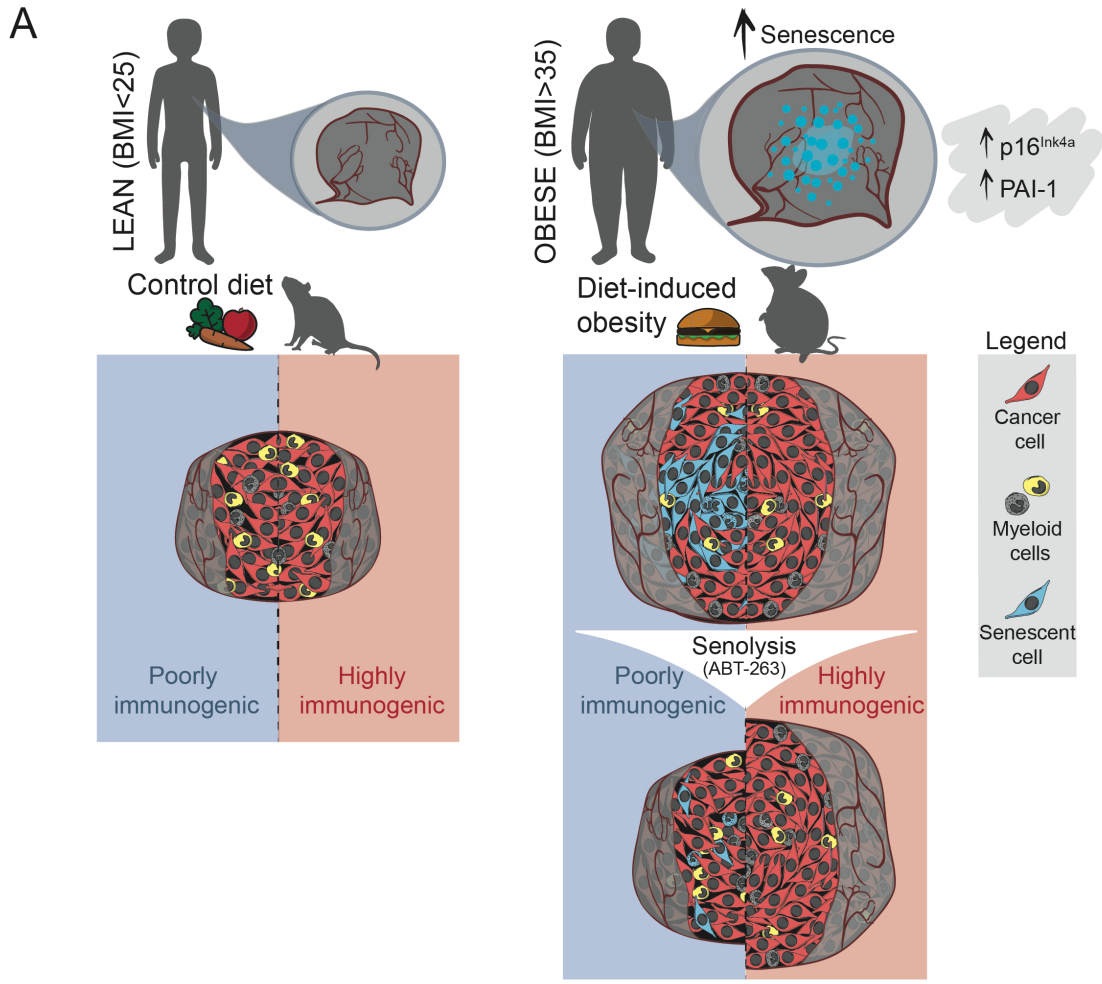


Figure 9. – Article 1 - Figure 4. Senolysis impedes accumulation of growth-arrested cancer cells in poorly immunogenic tumors during DIO

(A) Graphical abstract illustrating that late stages of cancers in obese patients share similar senescence feature than poorly immunogenic malignancies in mice. It highlights the role of obesity in triggering a protumoral senescence that is amenable to senolysis.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figures

- Supplementary Figure S1. Related to Figure 1, *Diet-induced obesity potentiates tumor growth and triggers tumoral senescence in poorly immunogenic tumors*
- Supplementary Figure S2. Related to Figure 2, *Therapeutic senolysis hinders obesity-driven tumor growth*
- Supplementary Figure S3. *Senolysis targets SA- β gal⁺ cancer cells in obese mice to limit tumor growth*
- Supplementary Figure S4. Related to Figure 3, *ABT-263 eliminates growth-arrested cancer cells in poorly immunogenic tumors during DIO*

ARRIVE Guidelines

Essential 10 guidelines including: 1) Study design, 2) Sample size, 3) Inclusion and exclusion criteria, 4) Randomization, 5) Blinding, 6) Outcome measures, 7) Statistical methods, 8) Experimental animals, 9) Experimental procedures and 10) Results

Supplementary Tables

- Supplementary Table S1. Clinical data of tumors analyzed in the study
- Supplementary Table S2. Primary antibodies
- Supplementary Table S3. Primer sequences
- Supplementary Table S4. Key resources related to the Methods
- Supplementary Table S5. Sample size justification for *in vivo* experiments

SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1

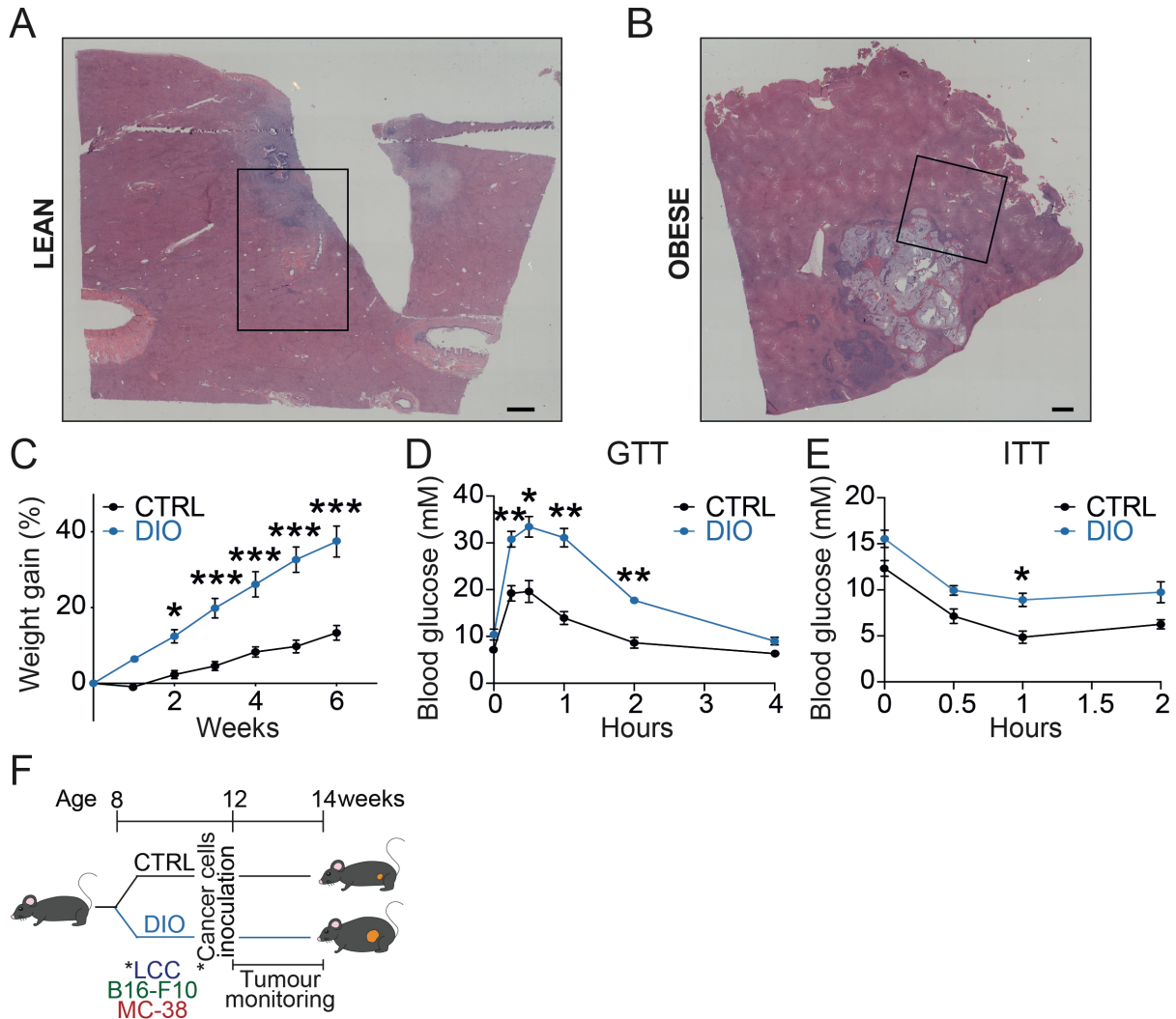


Figure 10. – Article 1 - Supplementary Figure S1. Related to Figure 1, diet-induced obesity potentiates tumour growth and triggers tumoral senescence in poorly immunogenic tumours

(A-B) Images shows H&E staining of human (A) lean and (B) obese samples used to represent immunofluorescence stainings in Figure 1A. Black squares represent regions from which depicted images were taken. (C) Weight gain curve represented as percentage of weight gain. (D) GTT of mice under DIO for 4 weeks and (E) ITT of animals under DIO for 5 weeks. (F) Schematic

representation of the experimental paradigm combining diet-induced obesity with LLC, B16-F10, and MC-38 cells syngeneic injections.

In vivo data represent ≥ 2 independent experiments with $n \geq 5$ biological replicates.

Statistics: Two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 95% CI. Error bars represent the mean \pm SEM. Each n represents one biological replicate.

Figure S2

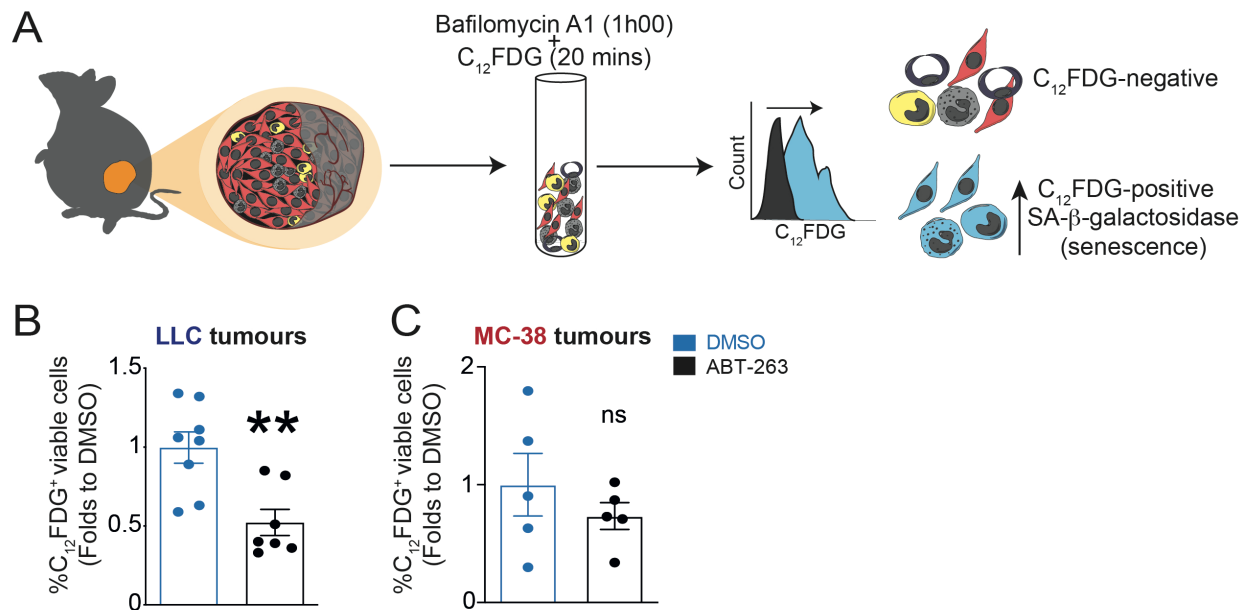


Figure 11. – Article 1 - Supplementary Figure S2. Related to Figure 2, therapeutic senolysis hinders obesity-driven tumour growth

(A) Schematic representation of the experimental strategy for the detection of SA- β -Gal activity at the single cell level using $C_{12}FDG$. (B-C) FACS quantification of $C_{12}FDG$ ⁺ viable (B) LLC or (C) MC-38 cells in whole tumours. Bar charts indicate the relative number of $C_{12}FDG$ ⁺ cells to total cells.

Data represent ≥ 2 independent experiments with ≥ 5 biological replicates.

Statistics: Two-tailed unpaired Student's *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. Error bars represent the mean \pm SEM. Each *n* represents one biological replicate

Figure S3

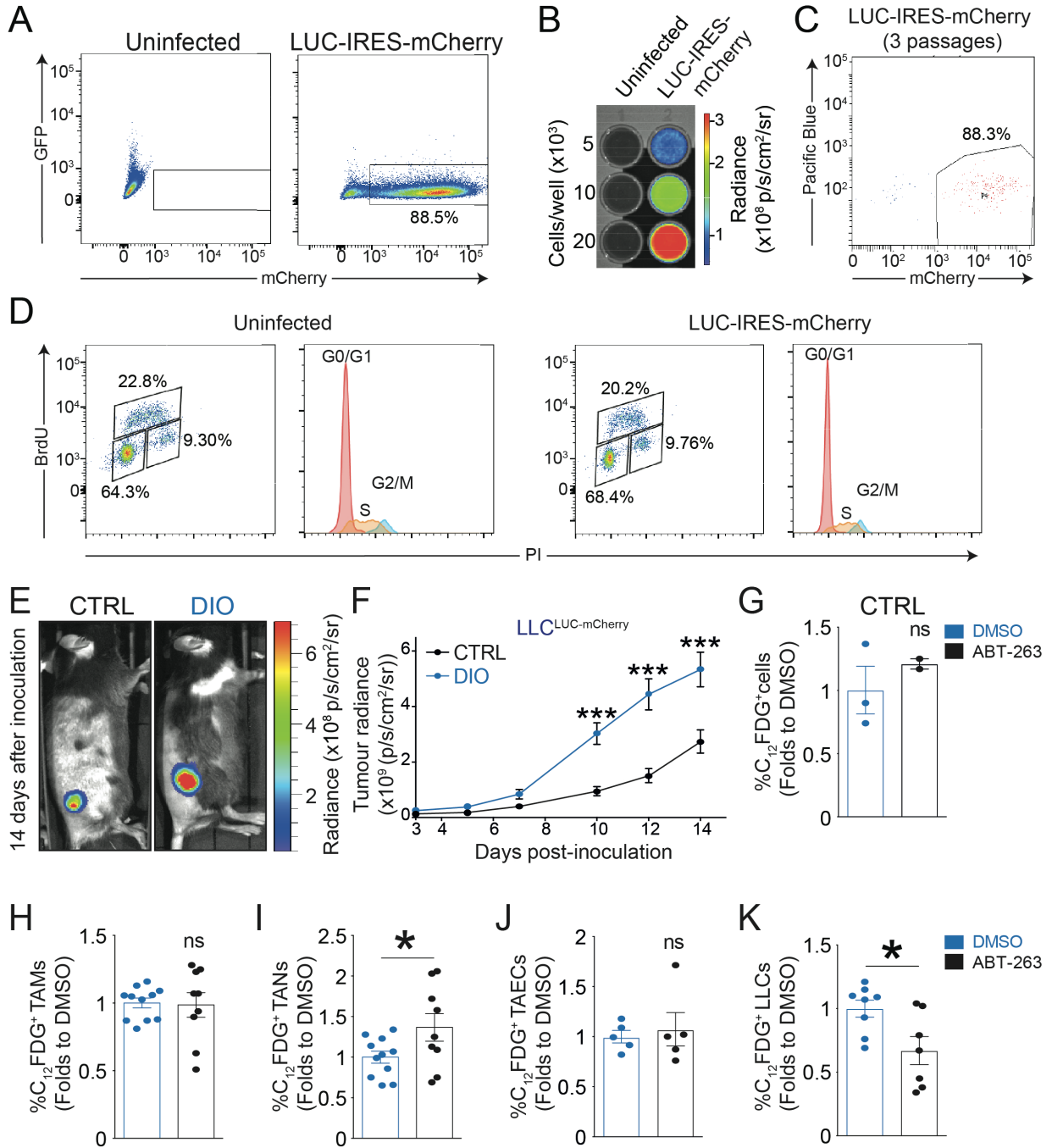


Figure 12. – Article 1 - Supplementary Figure S3. senolysis targets SA- β gal⁺ cancer cells in obese mice to limit tumour growth

(A) Illustrative histogram showing the population of mCherry⁺ cells following LLC cells transduction with the MSCV-LUC-IRES-mCherry plasmid. (B) Luciferase activity of mCherry⁺

LLC cells (LUC-IRES-mCherry cells) is dependent on the cell concentration *in vitro*. **(C)** Illustrative histogram showing the population of LUC-IRES-mCherry LLC cells *in vitro* following transduction. Percentage indicates proportion of mCherry⁺ LLC cells on total LLC cells **(D)** Illustrative histograms depicting the cell cycle state of uninfected LLC cells compared to LUC-IRES-mCherry LLC cells using PI and BrdU. Percentages indicate proportions of LLC cells in each cell cycle phase to total LLC cells. **(E)** Representative images of tumours *in vivo* from mice under DIO or CTRL diet at 14-days post-inoculation of LLC^{LUC-mCherry} cells obtained with *IVIS*. Images overlay the luminescent signals and are represented as radiance (p/s/cm²/sr). Imaging thresholds were optimized for minimizing inter-batch variation (min: 3.85e7; max:6.90e8). **(F)** Curve represents the tumour growth of LLC^{LUC-mCherry} cells in mice under DIO or CTRL diet monitored with *IVIS*. **(G)** FACS quantification of all cells in Ctrl mice inoculated with LLC cells. Bar charts indicate the relative percentage of C₁₂FDG⁺ cells on DMSO. **(H-K)** FACS quantification of C₁₂FDG⁺ **(H)** TAMs, **(I)** TANs, **(J)** TAECs, and **(K)** LLCs cells in whole tumours. Bar charts indicate the relative number of C₁₂FDG⁺ cells to total cells.

In vivo data represent ≥ 2 independent experiments with $n \geq 5$ biological replicates. FACS data represent ≥ 1 independent experiment with ≥ 2 biological replicates.

Statistics: Two-tailed unpaired Student's *t* test. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001. Error bars represent the mean \pm SEM. Each *n* represents one biological replicate.

Figure S4

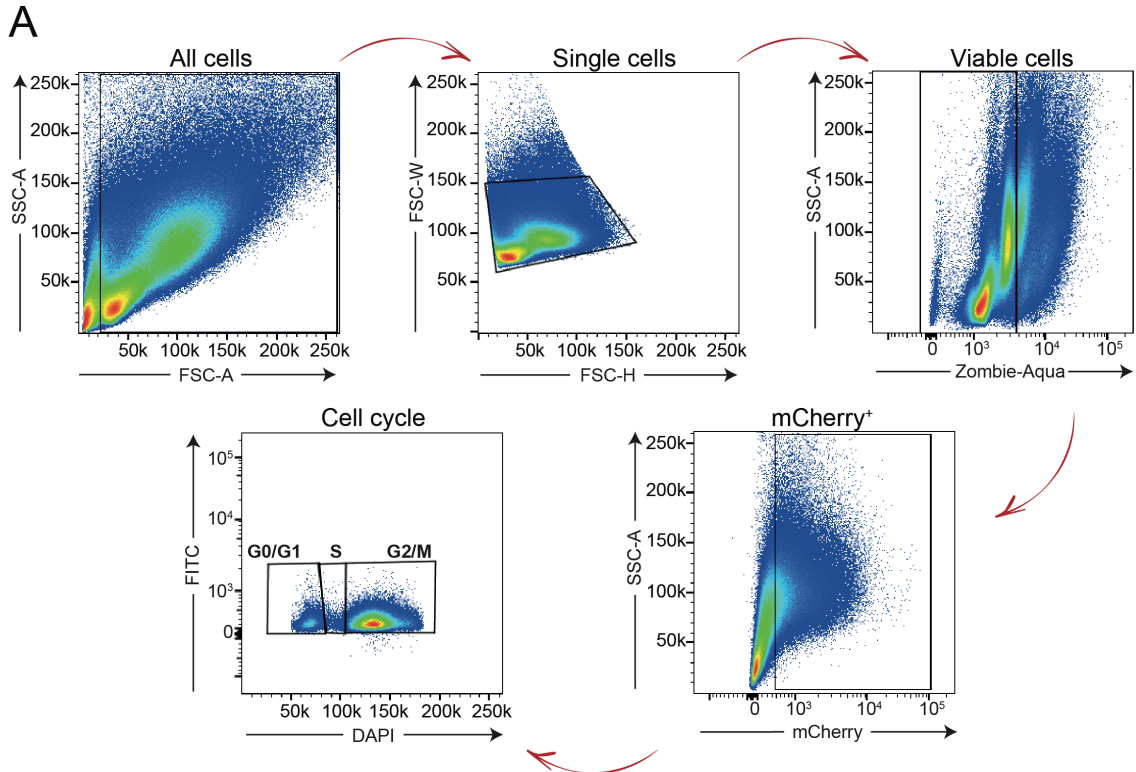


Figure 13. – Article 1 - Supplementary Figure S4. Related to Figure 3, ABT-263 eliminates growth-arrested cancer cells in poorly immunogenic tumors during DIO

(A) Gating strategy used to analyze the cell cycle status of viable LLC cells in tumors.

ARRIVE guidelines for animal research

Essential 10

Study design

1a. Groups compared: Our study uses the combination of two experimental models: A diet-induced obesity model (DIO) and a syngeneic tumour inoculation model. We fed 8-week-old C57Bl/6 WT mice with either a HFD (DIO) or a nutritionally matched RD (CTRL) for 6 weeks. After 4 weeks of diet, we inoculated LLC, B16-F10 and MC-38 cells via syngeneic injections and monitored tumour growth every second day for 2 weeks. We also orally administered ABT-263 to the animals for 5 consecutive days (from D7 to D11 post tumour inoculation). The dosage was of 75mg/kg/day and the control is DMSO (vehicle). For each *in vivo* experiments, tumours and other relevant tissues were dissected 14 days after tumour inoculations. Diagrams representing our experimental paradigms can be found in Supplementary Figure S1, S2 and Figure 2.

1b. Experimental unit: Each experimental unit (n) is typically an animal, or a tumour from an animal. Regarding the single cell analysis, the experimental unit is all the sorted cells from one tumour. When the number of cells of a sorted cell type in one tumour is low, we pooled multiple tumours together. The experimental unit is then the pooled cells from 2 or more tumours. The specific nature of the experimental unit is always specified in the figure legends.

Sample size

2a. The exact number of experimental units: The exact number of animals used might differ from the total experimental units showed in the figures following the respect of our inclusion/exclusion criteria (See next section). Supplementary Table S5 recapitulates all experimental units and animal numbers for each *in vivo* experiments of our study.

2b. Rationale behind sample size: The sample size of each experiment was based on previous experiments and existing literature references. 4 to 17 biological replicates per group were used for *in vivo* studies, as indicated in Supplementary Table S5.

Inclusion and exclusion criteria

3a. Criteria

Tumour ulceration: An experimental unit or an animal is excluded from the experiment when the tumour shows signs of an important ulceration. In addition to causing unnecessary pain to the animal, tumour ulceration affects the integrity of the tumour micro-environment and is therefore considered as an exclusion criterion.

Mouse reaches limit points: All animals used in our study were treated in agreement with the Animal Care Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and following the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care. All animals that would reach the limit points of our animal protocol (e.g. tumour ulceration, >20% weight loss, tumour volume that is exceeding 1.5cm³) would be euthanized and excluded from our study.

3b. All excluded units have not been considered in the statistical analysis and are presented in Supplementary Table S5.

3c. The exact values of n for all experiments of our study are shown in Supplementary Table S5 and in the Figure section.

Randomization

4a. Randomization method: Animals were randomized using the online GraphPad Prism random number generator. However, for the sake of space at our animal facility, mice were kept in the least cage possible. Thus, small modifications to the randomization were done with respect to the space constraints. Also, ABT-263 treated mice (vs DMSO vehicle) were determined before tumour inoculation by another investigator to avoid biases.

4b. Strategy to minimize potential confounders: All tumour inoculations and tumour monitoring measurements were done by the same person. Tumour inoculations were performed blindly. All animal cages were always kept on the same lanes on the experimental rack in the animal facility, but cages were moved among that lane at every tumour monitoring day (every second day). All tumour monitoring handling and animal dissections were performed in the morning by the same investigators (7h00-10h00).

Blinding

Tumour inoculations were performed blindly. One investigator put the animals to sleep, while the other injected the cancer cells subcutaneously without knowing about the animal diet, genetic background, or treatment (ABT-263 or DMSO). During tumour monitoring, the principal

investigator knew which group was assessed in which order. Concerning the senolytic experiment, animals receiving the treatment were determined prior to tumour inoculation in a randomized fashion and the investigator treating mice by gavage became aware of the dedicated group of each mouse at the moment of the first treatment. The outcome analysis was always confirmed by at least a second independent investigator, and data analysis were confirmed or performed by a different investigator (third party) to avoid bias.

Outcome measures

6a. Outcome measure assessed: The outcome measures are always specified in figure legends to allow total transparency. Here are the outcome measures justifications for the *in vivo* experiments. All *ex vivo* outcome measures are also clearly specified in the Figure legends section.

Tumor monitoring units: volumetric measurements (length and width) and radiance measures (p/s/cm²/sr) were employed to evaluate tumour volume at each time point. We used two complementary assessments to overcome possible biases and/or artefacts, such as skin color, tumour depth, cell types heterogeneity, tissue fibrosis, etc. Bioluminescent signal from cancer cells were showed as radiance to illustrate the photon emission intensity from an animal per second, as opposed to a total count of photon incident on a detector.

Weight gain units: We are showing percentage of weight gain through time. This outcome measure considers the initial weight of each animal on the average weight gain of each group.

6b. Primary outcome measure: This work does not primarily focus on a therapy efficiency or the impact of a given treatment on a phenotype. Our hypothesis was not only verified via therapeutical *in vivo* experiments. Several outcome measures were considered and explicitly described in the Methods and Figure legends sections.

Statistical methods

7a. Statistical methods details: All the statistical methods that were used are mentioned and explained in the appropriate section of the Figure legends. Every graph illustrates the mean value \pm the standard error of mean (Mean \pm SEM) and each symbol on the graphs represent one experimental unit. The choice of the statistical analysis took into consideration the number of groups and the number of variables that are compared within one single analysis. When necessary,

our data was normalized on a housekeeping gene and on the control group (RD-WT). Further information regarding data normalization is mentioned in the Figure legends section.

7b. Methods used to assess whether the data met the assumption of the statistical approach: We did not use any test for normality or performed any data transformation. All included experimental units (see Supplementary Table S5) were plotted on graphs and represented as a symbol to show biological variability among groups and parametric analysis were performed to assess whether difference observed were biologically relevant and significant.

Experimental animals

8a & b. Animals appropriate details: Details about experimental animals and cell lines that were either used or produced for this article are exhaustively described in the Methods section. In brief, the cancer cell lines cultured and inoculated were the Lewis Lung Carcinoma cell line LLC1 (referred in this paper as LLC), the B16-F10 melanoma cell line and the MC-38 colorectal cell line. We generated a LLC transgene expressing the mCherry and the Luciferase protein reporters, which allowed us to follow LLC cells both *in vivo* and *ex vivo* using their fluorescent and bioluminescent properties. C57BL/6J WT mice were purchased from the Jackson Laboratory and bred in house. 8-week-old male mice were put under a HFD (DIO) or a control nutritionally-matched RD (CTRL) for 4 weeks prior to tumour inoculation.

Experimental procedures

9a. What was done, how it was done and what was used? Experimental paradigms are exhaustively described in the Methods section and schematics representing the experimental timeline are available in the paper figures.

9b. When and how often? All strains were kept in 12h-12h light & dark cycles with free access to water and food. All the *in vivo* tumour monitoring experiments and animal sacrifices/terminal surgical interventions were performed in the morning (7am-10am). All weight measurements were done once a week in the afternoon (1pm-4pm).

9c. Where? All animals' procedures were performed by the same investigators in the same dedicated space within the animal facility. All the procedures were done at the same site for all the animals involved in this study.

9d. Why? Rationale for the different procedures is described in the Methods section.

Results

10a. Summary descriptive statistics for each experimental group: See Supplementary Table S5 and section 7 for a summary descriptive. The Figure legends section also presents an exhaustive summary of all experimental units and statistics used for each experiment.

10b. Effect size with a confidence interval: All analysis performed, with a statistically significant result or not, are reported in the Figure section along with the experimental units that were used for each one of them so that the reader can appreciate the attention we put on biological relevance (See also Supplementary Table S5). Moreover, every experimental unit is shown and represented as a symbol on the graphs. In sum, although we did not strictly perform effect size calculations, we always took into consideration the biological relevance of an experimental change by considering fold change between groups and confidence intervals.

SUPPLEMENTARY TABLES

Tableau 1. – Article 1 - Supplementary Table S1. Clinical data of tumors analyzed in the study

PATIENT	BMI	SEX	AGE	RUBBIA BRANDT	BLAZE R	# LESIONS	TUMOR (CM)
LEAN 1	18.9	M	65	4	minor	1	3.2
LEAN 2	15.7	M	56	3	major	1	2.5
LEAN 3*	18.2	F	64	3	major	2	0.6
OBESE 1	39.7	M	62	No data	No data	1	5.0
OBESE 2*	45.6	F	68	4	minor	1	1.5
OBESE 3	35.1	M	67	4	minor	3	2.5

*Representative images depicted in Figure 1A

Tableau 2. – Article 1 - Supplementary Table S2. Primary antibodies

ANTIBODY	METHOD	CLONE	SPECIE	DILUTION	SOURCE	CAT#
BrdU (APC)	FACS	Bu20a	Mouse	Titration by lot	Biolegend	339807
β-ACTIN	WB	N/A	Mouse	1:5000	Cell Signalling	3700S
BCL-2	WB	N/A	Rabbit	1:1000	Abcam	ab182858
BCL-w	WB	N/A	Goat	1:1000	R&D Systems	AF8241
BCL-xL	WB	N/A	Rabbit	1:1000	Cell Signalling	2764S
C ₁₂ FDG-FITC	FACS	N/A	N/A	2mM	Invitrogen	D2893
CD11B (BV711)	FACS	M1/70	Rat	Titration by lot	Biolegend	101242
CD11C (BV786)	FACS	N418	Armenian Hasmter	Titration by lot	Biolegend	117335
CD16/32 (Fc Block)	FACS	93	Rat	1μL/10 ⁶ cells	Biolegend	101330
CD31 (APC)	FACS	MEC 13.3	Rat	Titration by lot	BD Pharmingen	551262
CD45.2 (AlexaFluor700)	FACS	104	Mouse	Titration by lot	Biolegend	109822
CD64 (APC)	FACS	X54- 5/7.1	Mouse	Titration by lot	Biolegend	139305
F4/80 (PE/Cy7)	FACS	BM8	Rat	Titration by lot	Biolegend	123114
IgG2 _{ak} (APC)	FACS	N/A	Rat	Titration by lot	BD Pharmingen	553932
Ly-6G (APC/Cy7)	FACS	1A8	Rat	Titration by lot	Biolegend	127624
p16 ^{INK4A}	WB	N/A	Rabbit	1:500	Abcam	ab211542
p16 ^{INK4A}	IF	N/A	Rat	1:100	Abcam	ab241543
PAI-1	IF	N/A	Mouse	1:100	Santa Cruz	sc-5297
PAI-1	WB	N/A	Mouse	1:500	Santa Cruz	sc-5297

Tableau 3. – Article 1 - Supplementary Table S2. Primer sequences

<i>Gene</i>	Primer sequence	
<i>mActb</i>	Forward	GACGGCCAGGTCATCACTATTG
	Reverse	CCACAGGATTCCATACCCAAGA
<i>mIl6</i>	Forward	CTTCCATCCAGTTGCCTTC
	Reverse	ATTTCCACGATTTCCCAGAG
<i>miNos</i>	Forward	CGGCAAACATGACTTCAGGC
	Reverse	GCACATCAAAGCGGCCATAG
<i>mSerpine1</i>	Forward	TGACGTCGTGGAAGTGC
	Reverse	GAAAGACTTGTGAAGTCGGC
<i>mTgfb1</i>	Forward	ACGCCTGAGTGGCTGTCTTTTGAC
	Reverse	GGGCTGATCCCGTTGATTTCCACG
<i>mVegfa</i>	Forward	GCCCTGAGTCAAGAGGACAG
	Reverse	CTCCTAGGCCCTCAGAAGT

Tableau 4. – Article 1 - Supplementary Table S3. Key resources related to the Methods

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Bacterial and Virus Strains		
Gamma-retrovirus	Neault M <i>et al.</i> , Cell Reports, 2016	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
ABT-263	Selleckchem.com	Cat# S1001
Bafilomycin A1	Sigma Aldrich	Cat# B1793
BrdU	Abcam	Cat# ab142567
C ₁₂ FDG (FITC)	Invitrogen	Cat# D2893
Collagenase IV	Worthington	Cat# LS004188
DAPI	Sigma Aldrich	Cat# D9542
D-Luciferine potassium salt	Perkin Elmer	Cat# 122799
DNaseI	Sigma Aldrich	Cat# D4527
Hexadimethrine bromide	Sigma Aldrich	Cat#107689
HumulinR (Insulin)	Lilly	Cat# DIN00586714
Liberase TL	Sigma Aldrich	Cat#540120001
Lipofectamine® 2000	Invitrogen	Cat# 11-668-019
Phosphatase inhibitor	Sigma Aldrich	Cat# P5726
2-Propanol	Sigma Aldrich	Cat# 650447
Propidium Iodide	Sigma Aldrich	Cat# P4864-10mL
Protease inhibitor	Sigma Aldrich	Cat# P8340
RBC Lysis Buffer	Invitrogen	Cat# 00-4333057
UltraComp eBeads	Invitrogen	Cat# 01-2222-42
X-Gal	BioShop	Cat# XGA00.1
Xylenes	Sigma Aldrich	Cat# 214736

Zombie aqua	Biolegend	Cat#423102
Critical Commercial Assays		
Cytofix/Cytoperm kit	Biosciences	Cat# 554714
Mouse & rabbit HRP/DAB (ABC) detection IHC kit	Abcam	ab64264
QuantiPro BCA Assay Kit	Sigma Aldrich	Cat# QBPCA-1KT
Experimental Models: Cell Lines		
B16-F10	ATCC	CRL-6475
HEK 293T	ATCC	CRL-3216
Lewis Lung Carcinoma (LLC)	ATCC	CRL-1642
Lewis Lung Carcinoma (LLC ^{LUC-mCherry})	This paper	N/A
MC-38	ATCC	
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6J (referred as WT)	Jackson Laboratories	No.000664
Recombinant DNA		
Plasmid: MSCV-LUC-IRES-mCherry	MI-Luciferase-IRES-mCherry was a gift from Xiaping Sun (Addgene plasmid; http://n2t.net/addgene:75020)	Cat# 75020; RRID: Addgene_75020
Plasmid: pCL-ECO	pCL-ECO was a gift from Inder Verma (Addgene plasmid # 12371 ; http://n2t.net/Addgene:12371)	Cat#12371; RRID: Addgene_12371
Software and Algorithms		
Fiji (ImageJ)	https://imagej.net/Fiji	V1.0
FlowJo	https://www.flowjo.com/	V10.2
GraphPad Prism	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/	V8.4.3

Living Image	Perkin Elmer (https://www.perkinelmer.com/fr/lab-products-and-services/resources/in-vivo-imaging-software-downloads.html)	V4.7.3
Other		
AlphaTrak2 blood glucose test strips	Zoetis	Cat# 71681-01
Mouse diet: High Fat Diet 60% lipids	Research Diet	Cat#D12492
Mouse diet: Regular Diet 10% lipids	Research Diet	Cat#D12450J

Tableau 5. – Article 1 - Supplementary Table S4. Sample size justification for *in vivo* experiments

Figure	Experiment	Cancer cell line	Group/ Condition	N	Total mouse number (Δ)	Exclusion/inclusion criteria	
1C	Tumour monitoring <i>in vivo</i>	LLC	CTRL-WT	6	6	1. Tumour ulceration 2. Mouse reaches limit points (CCPA)	
			DIO-WT	7	7		
1D	Tumour monitoring <i>in vivo</i>	B16-F10	CTRL-WT	6	6		
			DIO-WT	5	5		
1E	Tumour monitoring <i>in vivo</i>	MC-38	CTRL-WT	6	6		
			DIO-WT	6	6		
S1C	Weight gain monitoring	N/A	CTRL-WT	10	10		1. Mouse reaches limit points (CCPA)
			DIO-WT	11	11		
S1D-E	GTT/ITT	N/A	CTRL-WT	5	5		1. Mouse reaches limit points (CCPA)
			DIO-WT	5	5		
2B	Tumour monitoring <i>in vivo</i>	MC-38	DIO-WT-DMSO	5	5	1. Tumour ulceration 2. Mouse reaches limit points (CCPA)	
			DIO-WT-ABT263	5	5		
2C	Tumour monitoring <i>in vivo</i>	LLC	DIO-WT-DMSO	9	9	1. Tumour ulceration 2. Mouse reaches limit points (CCPA)	
			DIO-WT-ABT263	9	9		
3A	Tumour monitoring <i>in vivo</i>	LLC ^{LUC-mCherry}	CTRL-WT-DMSO	6	6	1. Tumour ulceration 2. Mouse reaches limit points (CCPA)	
			CTRL-WT-ABT263	5	5		
			DIO-WT-DMSO	4	4		
			DIO-WT-ABT263	5	5		
S3E	Tumour monitoring <i>in vivo</i>	LLC ^{LUC-mCherry}	CTRL-WT	5	6(1)	1. Tumour ulceration 2. Mouse reaches limit points (CCPA)	
			DIO-WT	7	7		

*Numbers in red represent the number of excluded animals when applicable

REFERENCES

1. Avgerinos, K.I., et al., Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*, 2019. **92**: p. 121-135.
2. Calle, E.E., et al., Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
3. Meldrum, D.R., M.A. Morris, and J.C. Gambone, Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will? *Fertil Steril*, 2017. **107**(4): p. 833- 839.
4. Khandekar, M.J., P. Cohen, and B.M. Spiegelman, Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(12): p. 886-95.
5. O'Flanagan, C.H., L.W. Bowers, and S.D. Hursting, A weighty problem: metabolic perturbations and the obesity-cancer link. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2015. **23**(2): p. 47-57.
6. Deng, T., et al., Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu Rev Pathol*, 2016. **11**: p. 421-49.
7. Iyengar, N.M., et al., Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(35): p. 4270-4276.
8. Kolb, R., F.S. Sutterwala, and W. Zhang, Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Curr Opin Pharmacol*, 2016. **29**: p. 77-89.
9. Franceschi, C., Healthy ageing in 2016: Obesity in geroscience - is cellular senescence the culprit? *Nat Rev Endocrinol*, 2017. **13**(2): p. 76-78.
10. Kennedy, B.K., et al., Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*, 2014. **159**(4): p. 709-13.
11. van Deursen, J.M., The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 2014. **509**(7501): p. 439-46.
12. Calcinotto, A., et al., Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*, 2019. **99**(2): p. 1047-1078.
13. Minamino, T., et al., A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*, 2009. **15**(9): p. 1082-7.
14. Schafer, M.J., et al., Exercise Prevents Diet-Induced Cellular Senescence in Adipose Tissue. *Diabetes*, 2016. **65**(6): p. 1606-15.

15. Ogrodnik, M., et al., Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15691.
16. Munoz-Espin, D. and M. Serrano, Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(7): p. 482-96.
17. Storer, M., et al., Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 2013. **155**(5): p. 1119-30.
18. Munoz-Espin, D., et al., Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 2013. **155**(5): p. 1104-18.
19. Demaria, M., et al., An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*, 2014. **31**(6): p. 722-33.
20. Binet, F., et al., Neutrophil extracellular traps target senescent vasculature for tissue remodeling in retinopathy. *Science*, 2020. **369**(6506).
21. Crespo-Garcia, S., et al., Pathological angiogenesis in retinopathy engages cellular senescence and is amenable to therapeutic elimination via BCL-xL inhibition. *Cell Metab*, 2021. **33**(4): p. 818-832 e7.
22. Oubaha, M., et al., Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy. *Science Translational Medicine*, 2016. **8**(362): p. 362ra144-362ra144.
23. Eggert, T., et al., Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*, 2016. **30**(4): p. 533-547.
24. Coppe, J.P., et al., The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 2010. **5**: p. 99-118.
25. Gustafson, B., A. Nerstedt, and U. Smith, Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 2757.
26. Li, Q., et al., Obesity and hyperinsulinemia drive adipocytes to activate a cell cycle program and senesce. *Nat Med*, 2021. **27**(11): p. 1941-1953.
27. Palmer, A.K., et al., Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell*, 2019. **18**(3): p. e12950.
28. Schafer, M.J., J.D. Miller, and N.K. LeBrasseur, Cellular senescence: Implications for metabolic disease. *Mol Cell Endocrinol*, 2017. **455**: p. 93-102.

29. Tchkonina, T., et al., Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*, 2010. **9**(5): p. 667-84.
30. Trim, W., J.E. Turner, and D. Thompson, Parallels in Immunometabolic Adipose Tissue Dysfunction with Ageing and Obesity. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 169.
31. Hwang, H.J., et al., Endothelial cells under therapy-induced senescence secrete CXCL11, which increases aggressiveness of breast cancer cells. *Cancer Lett*, 2020. **490**: p. 100- 110.
32. Yasuda, T., et al., Inflammation-driven senescence-associated secretory phenotype in cancer-associated fibroblasts enhances peritoneal dissemination. *Cell Rep*, 2021. **34**(8): p. 108779.
33. Yoshimoto, S., et al., Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 2013. **499**(7456): p. 97-101.
34. Zhu, Y., et al., Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*, 2016. **15**(3): p. 428-35.
35. Zhu, Y., et al., The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 2015. **14**(4): p. 644-58.
36. Gonzalez-Gualda, E., et al., A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J*, 2021. **288**(1): p. 56-80.
37. Chang, J., et al., Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med*, 2016. **22**(1): p. 78-83.
38. Yosef, R., et al., Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11190.
39. Diepstraten, S.T., et al., The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs. *Nat Rev Cancer*, 2022. **22**(1): p. 45-64.
40. Xu, M., et al., Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*, 2018. **24**(8): p. 1246-1256.
41. Mylonas, K.J., et al., Cellular senescence inhibits renal regeneration after injury in mice, with senolytic treatment promoting repair. *Sci Transl Med*, 2021. **13**(594).
42. Bussian, T.J., et al., Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*, 2018. **562**(7728): p. 578-582.

43. Gandhi, L., et al., Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(7): p. 909-16.
44. Sharma, A.K., et al., The Senolytic Drug Navitoclax (ABT-263) Causes Trabecular Bone Loss and Impaired Osteoprogenitor Function in Aged Mice. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 354.
45. Kaefer, A., et al., Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis of navitoclax (ABT-263) induced thrombocytopenia. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014. **74**(3): p. 593-602.
46. Rudin, C.M., et al., Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(11): p. 3163-9.
47. Carpenter, V.J., T. Saleh, and D.A. Gewirtz, Senolytics for Cancer Therapy: Is All That Glitters Really Gold? *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(4).
48. Xue Hao, B.Z., Wei Zhou, Heng Liu, Takeshi Fukumoto, Dmitry Gabrilovich, Rugang Zhang, Sensitization of ovarian tumor to immune checkpoint blockade by boosting senescence-associated secretory phenotype. *iScience*, 2021. **24**.
49. Demaria, M., et al., Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov*, 2017. **7**(2): p. 165-176.
50. Prasanna, P.G., et al., Therapy-Induced Senescence: Opportunities to Improve Anticancer Therapy. *J Natl Cancer Inst*, 2021. **113**(10): p. 1285-1298.
51. Wang, B., J. Kohli, and M. Demaria, Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends Cancer*, 2020. **6**(10): p. 838-857.
52. Toso, A., et al., Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep*, 2014. **9**(1): p. 75-89.
53. Jochems, F., et al., The Cancer SENESCopedia: A delineation of cancer cell senescence. *Cell Rep*, 2021. **36**(4): p. 109441.
54. Yousefzadeh, M.J., et al., An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. *Nature*, 2021. **594**(7861): p. 100-105.
55. Ringel, A.E., et al., Obesity Shapes Metabolism in the Tumor Microenvironment to Suppress Anti-Tumor Immunity. *Cell*, 2020. **183**(7): p. 1848-1866 e26.

56. Prata, L., et al., Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Semin Immunol*, 2018. **40**: p. 101275.
57. Bertram, J.S. and P. Janik, Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett*, 1980. **11**(1): p. 63-73.
58. Lechner, M.G., et al., Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J Immunother*, 2013. **36**(9): p. 477-89.
59. Mosely, S.I., et al., Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery. *Cancer Immunol Res*, 2017. **5**(1): p. 29-41.
60. Cang, S., et al., ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *J Hematol Oncol*, 2015. **8**: p. 129.
61. Debacq-Chainiaux, F., et al., Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 2009. **4**(12): p. 1798-806.
62. Lauby-Secretan, B., et al., Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*, 2016. **375**(8): p. 794-8.
63. Ogrodnik, M., et al., Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. *Cell Metab*, 2019. **29**(5): p. 1233.
64. Chatsirisupachai, K., et al., A human tissue-specific transcriptomic analysis reveals a complex relationship between aging, cancer, and cellular senescence. *Aging Cell*, 2019. **18**(6): p. e13041.
65. Romagosa, C., et al., p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*, 2011. **30**(18): p. 2087-97.
66. Witkiewicz, A.K., et al., The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle*, 2011. **10**(15): p. 2497-503.
67. Yu, L., et al., Complete loss of miR-200 family induces EMT associated cellular senescence in gastric cancer. *Oncogene*, 2021.
68. Sierra-Ramirez, A., et al., Transient metabolic improvement in obese mice treated with navitoclax or dasatinib/quercetin. *Aging (Albany NY)*, 2020. **12**(12): p. 11337-11348.

69. Wilson, W.H., et al., Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(12): p. 1149-59.
70. Roberts, A.W., et al., Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(5): p. 488-96.
71. Kipps, T.J., et al., A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2015. **56**(10): p. 2826-33.
72. Percie du Sert, N., et al., Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol*, 2020. **18**(7): p. e3000411.
73. Neault, M., F.A. Mallette, and S. Richard, miR-137 Modulates a Tumor Suppressor Network-Inducing Senescence in Pancreatic Cancer Cells. *Cell Rep*, 2016. **14**(8): p. 1966-78.
74. Dimri, G.P., et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
75. Pozarowski, P. and Z. Darzynkiewicz, Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 2004. **281**: p. 301-11.

Chapitre 4

ARTICLE 2 - TLR4 elicits pro-tumoral senescence via myeloid-specific IRE1 α signaling in obesity

Article en préparation (Prêt pour soumission)

Authors: Frédéric Fournier¹, Frédérique Pilon², Rachel Juneau², Vera Guber², Manuel Buscarlet¹, Sergio Crespo-Garcia¹, Przemyslaw Sapieha^{1,2}

Affiliations:

¹Department of Biochemistry, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

²Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

Contact: Przemyslaw (Mike) Sapieha, Ph.D.
Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre
5415 Assumption Boulevard, Montreal,
QC, H1T 2M4, Canada.
TEL: (514) 252-3400 ext. 7711. FAX: (514) 252-3430

E-mail: mike.sapieha@umontreal.ca

ABSTRACT

Toll-like receptor 4 (TLR4) of myeloid origin plays a pivotal role in the innate immune system. Among its diverse functions, TLR4 signaling can influence the progression of cancer, the accumulation of body adiposity and weight gain. While recent studies report that TLR4 agonists benefit to cancer therapies, activation of TLR4 via different ligands can also be pro-tumorigenic. Since obesity is characterized by high levels of TLR4 ligands, we investigated cancer metastasis in tumors of obese patients and reported exacerbated expression of TLR4 in biopsies from obese patients. Since both obesity and cancer share molecular mechanisms and presence of low-grade chronic inflammation, we sought to determine if TLR4 determines key molecular causes in tumorigenesis influenced by obesity. Here, we report that tumor-associated myeloid cells of mice subjected to a diet-induced obesity are enriched for pathways of cellular senescence and endoplasmic reticulum (ER) stress response. When we ablated TLR4 in the host, we hindered tumor progression and cancer cell senescence specifically in poorly immunogenic tumors, and decreased ER stress. Moreover, we demonstrate that myeloid cells necessitate of IRE1 α expression to ensure tumor progression. Hence, we conclude that, in a context of low immunogenicity, myeloid cells are likely to favor tumorigenesis by engaging an IRE1 α -related pathways of ER stress via TLR4.

KEYWORDS

TLR4, cancer, obesity, myeloid cells, immunogenicity, cellular senescence, ER stress, IRE1 α

INTRODUCTION

The pattern recognition receptor Toll-like receptor 4 (TLR4) has a well-defined and pivotal role in the innate immune response [1]. An interesting yet underexplored function of TLR4 consists of its ability to influence weight gain, highlighting its implications in obesity [2, 3]. Despite obesity is a disease itself, the accumulation of body adiposity and chronic inflammation constitutes a remarkable risk factor for many others, including type 2 diabetes, hypertension, and cancer [4-8]. Chronic inflammation and fibrosis in the adipose tissue is accompanied by TLR4 activation, and some studies explored this phenomenon studying pathways of leptin and insulin resistance [5, 9-13]. Importantly, TLR4 has been shown to be of particular importance for many of these obesity-related conditions, and more particularly of cancer [13-17].

The implication of TLR4 signaling in tumor malignancies have been thoroughly described. TLR4 can either restrain [18-22] or promote tumor growth [23-28]. However, independently on its role, TLR4 dictates immune cell reactivity against cancer cells, also known as immunogenicity. Research seeking to improve existing cancer therapies demonstrated that TLR4 ligands contribute to increase response to treatment via modulating immunogenicity [18, 29-31].

TLR4 has several structurally unrelated ligands such as bacterial-derived lipopolysaccharides (LPS) [32], host alarmins (e.g. HMGB1, HSP70, fibrinogen) [33, 34], heat shock proteins [35], the hormone resistin [36], and saturated free fatty acids (FFAs) [37]. Many of them, such as FFAs [38], LPS [39, 40] and HMGB1 [41] are particularly elevated during weight gain and have been linked to the onset of inflammatory conditions intrinsic to obesity. Obesity participates in cancer development via a number of factors including inflammation, adipokines, elevated amount of lipids and macromolecules, insulin signaling and dysbiosis, many of these influenced by the interplay between TLR4 and its ligands (Reviewed in [42- 44]).

Very recently, the hallmarks in cancer have been revisited and updated with cellular senescence among them [45]. TLR4 has also been previously associated to cellular senescence as a response to DNA-damage [46, 47] or due to its activation with LPS [48]. Other TLR4 activators such as HMGB1 [49] and the FFA palmitic acid [50] have been also attributed to elicit a senescence-associated secretory phenotype (SASP). One of the main consequences of SASP involves high protein synthesis demand, which lead to proteotoxicity [51] and, consequently, the unfolded

protein response (UPR). The effectors that lead to UPR and endoplasmic reticulum (ER) stress to resolve proteotoxicity are relevant also to cancer and have been described to participate in tumorigenesis (Reviewed in [52]). However, whether TLR4 ligands induce cellular senescence *in vivo*, and if this process depends on ER stress in the context of cancer and obesity remains yet to be elucidated. In this study we show that TLR4 expression is selectively induced in tumors of patients with high BMI (>35), but not in lean cancer patients. Experimentally, we demonstrated that absence of TLR4 in the host protects from tumoral progression and cancer cell senescence, and that myeloid cells in the tumor microenvironment are likely to favor tumorigenesis by engaging on IRE1 α -related pathways of ER stress.

RESULTS

TLR4 participates in tumorigenesis during high body adiposity conditions

In order to assess differential expression of TLR4 in tumors during obesity, we screened human colorectal cancer metastasis in the liver of patients with either elevated BMI (>35) or control (>18 and <25). All tumors had similar size independently on the group (**Table 1**). Presence of TLR4 was remarkably exacerbated in the tumors of obese patients whereas it was practically inexistent in lean controls (**Figure 1A**). Several polymorphisms within the *TLR4* gene [2, 3], as well as its expression in peripheral blood mononuclear cells [53] is accompanied by elevated body mass index (BMI) are associated with increased weight gain in humans (**Supplementary Figure S1A**). Since TLR4 is a widely expressed receptor intimately associated with the innate immune system, we verified its expression using unbiased meta-analyses on publicly available resources found at BioGPS (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=7099>). Among all different human organs and cell types or cancer cell lines available, mRNA expression of TLR4 was preferentially expressed in myeloid cells, whole blood, and monocytes (**Figure 1B**). Of note, we report an enhanced TLR4 protein expression in DIO- subjected WT mice compared to control-fed WT mice (**Supplementary Figure S1B**).

To study experimentally the participation of TLR4 in cancers with low immunogenicity in a context of obesity, we subjected animals lacking TLR4 (*TLR4*^{-/-}) to a 6-week diet-induced obesity (DIO) to increase their body adiposity, and inoculated Lewis-Lung Carcinoma (LLC) cells subcutaneously. Tumors were monitored systematically during two weeks in either *TLR4*^{-/-} or wildtype (WT) control mice (**Figure 1C**). WT animals undergoing a regular (control) diet showed a steadily slow growth, whereas animals in DIO manifested rapidly evolving big tumors. In *TLR4*^{-/-} mice, tumors in either control diet or DIO did not thrive during the time-course, and the latest was significantly smaller with respect to the WT DIO group (**Figure 1C-D, Supplementary Figure S1C-D**).

To verify whether tumorigenesis driven by TLR4 expression in DIO is a specific mechanism in low immunogenic tumors (e.g. LLC), we used additional cell lines with mild (B16-F10) and high immunogenicity (MC- 38) to dissect the contribution of the innate immune system to tumor growth. In either case, tumor growth when using the B16-F10 (**Figure 1E, Supplementary Figure**

S1E) or MC-38 (**Figure 1F, Supplementary Figure S1F**) cell lines and rates of tumor progression were not as fast-progressing as in LLC-inoculated tumors in WT mice. Furthermore, when compared to TLR4^{-/-} during DIO, the only tumors to manifest a significant decrease were the ones from mice inoculated with LLC (**Figure 1D-F, Supplementary Figure S1D- F**). All inoculated cell lines were expressing TLR4, which allowed us to tease out the contribution of TLR4 in the host and the tumor microenvironment (TME) versus cancer cell resident TLR4 (**Supplementary Figure S1G**).

In a previous study (Fournier *et al.*, unpublished but submitted in this thesis), we have thoroughly demonstrated that low immunogenic LLC-inoculated tumors present a distinct senescence-associated molecular signature during DIO. While senolysis is controversial in treating cancer, we proved that in a context of obesity, inhibition of BCL-2 family proteins proved efficient in ablating senescent tumoral cells and hindering tumor growth. These aftereffects of senescence in the tumor were not present when tumor cell lines were high immunogenic.

Given the relevance of the myeloid lineage in the metabolism of low immunogenic tumors, we isolated myeloid cells from LLC-derived tumors in DIO or diet control. For this purpose, we used the reporter mouse – otherwise WT– R26R-EYFP and performed transcriptomic analyses using Ampli-Seq. GSEA gene analysis of Hallmarks revealed a number of pathways significantly upregulated in the DIO including pathways related to inflammation and cancer, but also endoplasmic reticulum (ER) stress and cellular senescence (**Figure 1G**).

Altogether, these observations with regard to exacerbated tumor growth in the WT with LLC-driven tumors suggest that TLR4 in the host participates directly of tumorigenesis during an obesity milieu, and that myeloid cells in the tumor engage with multiple pathways including cellular senescence and ER stress.

Host expression of TLR4 dictates cancer cell senescence in the tumor under the influence of a chronic inflammatory milieu

Myeloid cells associated to the tumor during DIO express a number of pathways related to senescence among their top significantly upregulated Hallmarks. By screening at gene sets typically associated to cellular senescence, we performed GSEA analyses on DIO-tumor myeloid cells. This analysis revealed a positive association with *Fridman_Senescence_UP* and

Global_Senescence_Literature_Curated_2020 (**Figure 2A-B**) gene sets. Next, we sought to determine the specific contribution of TLR4 in DIO with regards to tumoral cellular senescence.

We firstly verified the participation of TLR4 on the transcription of typical senescence-associated secretory phenotype (SASP) related cytokines by means of qPCR. In TLR4^{-/-} tumors, expression of *I1b*, *Il6*, *Cxcl1*, *Serpine1* was found significantly downregulated when compared to WT tumors. *Vegfa* did not show changes in expression levels regardless of differences in tumor size (**Figure 2C**). Using LLC-inoculated tumors of either WT or TLR4^{-/-} during DIO, we firstly determined cellular senescence via detection of senescence-associated (SA) β -galactosidase activity in tumor cross sections. Surprisingly, WT tumors revealed a large area of the tumor SA- β -galactosidase-positive, whereas in TLR4^{-/-} the staining was barely present (**Figure 2D-E**).

We next sought to determine whether specific cell types in the tumor microenvironment are more susceptible to become senescent in DIO. For this purpose, we developed an assay to evaluate *in vivo* SA- β -galactosidase activity at a cellular level by means of fluorescence-associated cell sorting (FACS) (**Figure 2F**). Tumor-associated endothelial cells (TAECs) (**Figure 2G, Supplementary Figure S2A**) did not show significant changes. As we expected, myeloid lineage tumor-associated neutrophils (TANs) (**Figure 2H, Supplementary Figure S2B**) and tumor-associated macrophages (TAMs) (**Figure 2I, Supplementary Figure S2C**) had the highest basal expression of SA- β -galactosidase activity, and more importantly, showed a significant reduction in the TLR4^{-/-} tumors. Interestingly, the highest reduction in the percentage and the density (positive cells per gram of tumor) of cells with SA- β -galactosidase activity was observed among cancer (LLC-mCherry) cells in TLR4^{-/-} tumors (**Figure 2J, Supplementary Figure S2D**).

Engagement of cellular senescence was then verified by analyzing protein expression of the key cycle regulator (p16^{INK4A} and p53) and anti-apoptotic proteins from the BCL-2 family (BCLxL and BCL-2) associated to senescence specifically in TAMs (**Figure 2K**) and cancer cells (**Figure 2L**). Surprisingly, expression of p16^{INK4A}, p53, BCL-xL and BCL-2 in TAMs did not show significant differences in TLR4^{-/-} tumors (**Figure 2K**). However, in cancer cells these differences were striking and TLR4^{-/-} tumor LLCs showed very low levels of expression (**Figure 2L**). Furthermore, in an effort to determine if the TAMs and the LLC cells were undergoing cellular senescence, we assessed their cell cycle status in the tumors. While TAMs cell cycle was

unaffected by the lack of TLR4 (**Figure 2M**), LLC cells in G0/G1 phases was significantly decreased in *Tlr4*^{-/-} mice (WT: 39.5%; *Tlr4*^{-/-}: 12.5%), which was compensated by an increase in cells in G2/M phases (WT: 50.4%; *Tlr4*^{-/-}: 75.4%) (**Figure 2N**). Altogether these data suggest that cellular senescence, and particularly cancer cell senescence, contribute to tumor growth and requires the expression of TLR4.

TLR4 elicit IRE1 α -driven ER stress in myeloid cells associated to the tumor

Among the multiple biological processes that trigger tumorigenesis, a number of studies have proposed ER stress as a hallmark in the progression of cancer and key pro-tumoral mechanism (Reviewed in [52]). We previously showed that myeloid cells in tumors during DIO express a number of pathways related to ER stress (**Figure 1G**). In order to dissect whether this mechanism dictates tumorigenesis in a context of high body adiposity, we determined expression of key ER stress effectors in tumor lysates of animals subjected to control diet or DIO. Among all targets analyzed, we did not find significant differences in ATF6 (**Figure 3A**) or p-PERK (**Figure 3B**). Interestingly, expression of p-IRE1 α was found to be significantly increased in DIO (**Figure 3C**). GSEA analysis for specific ER stress pathways *XBPI_01* (**Figure 3D**) and GO_Ire1_Mediated_Unfolded_Protein_Response (**Figure 3E**) confirmed enrichment for these pathways in TAMs from tumors of animals subjected to DIO (Ampli-Seq data shown in **Figure 1G**).

To understand the engagement of ER stress specifically in cancer cells (LLC) or TAMs from tumors of either control or DIO animals, we assessed p-IRE1 α expression in sorted cells. Albeit cancer cells did not show increased phosphorylation levels (**Figure 3F**), p-IRE1 α levels were significantly higher in TAMs during DIO (**Figure 3G**).

To test our hypothesis that this mechanism depends on TLR4 signaling specifically in myeloid cells to engage IRE1 α -mediated ER stress, we evaluated splicing of XBP1 (XBP1s) in tumors of TLR4^{-/-} mice undergoing DIO. Levels of XBP1s were significantly increased in DIO tumor lysates of WT mice, but this augmentation did not occur in TLR4^{-/-} (**Figure 3H**). We supported this finding by analyzing levels of p-IRE1 α specifically in TAMs recovered from tumors of TLR4^{-/-} mice, where we observed a significant decreased of phosphorylation when compared to WT tumors in DIO (**Figure 3I**). Phosphorylation of IRE1 α was similarly increased in whole tumors of

DIO-subjected mice expressing TLR4 compared to both control-fed and TLR4^{-/-} mice (**Supplementary Figure S3A**).

Myeloid-specific IRE1α impacts tumorigenesis and cellular senescence during DIO

In order to understand the contribution of myeloid lineage specific IRE1α signaling to tumorigenesis and cancer cell senescence, we generated a mouse model lacking expression of *Ern1* in the myeloid lineage (*LysMCre-Ern^{-/-}*), hereafter referred as ERN1Lys^{-/-}, and inoculated low immunogenic LLC cancer cells and monitored tumor progression during DIO or control diet (**Figure 4A**). As previously demonstrated with the WT, tumors in DIO thrived and developed rapidly after inoculation. On the other hand, the tumors barely developed in absence of IRE1α during DIO (**Figure 4B, Supplementary Figure S4A**).

To characterize whether this phenotype in tumor development was accompanied by a lack of cellular senescence, we evaluated the expression of key cell cycle regulators (p16^{INK4A}, p21^{CIP1} and p53), anti-apoptotic proteins from the BCL-2 family (BCL-xL, BCL-2, and BCL-w), and the SASP factor PAI-1. ERN1Lys^{-/-} mice showed decreased expression of p53, PAI-1, BCL-xL, BCL-2, and p16^{INK4A} in tumor lysates (**Figure 4C**). We also observed a decrease in the gene expression of *Il1b* (p=0.07), *Il6* and *Vegfa*, typically associated to SASP (**Figure 4D**), as well as in SA-β-galactosidase activity in tumor cross sections of ERN1Lys^{-/-} mice (**Figure 4E-F**). When dissecting the specificity of SA-β-galactosidase activity to a cellular level with FACS, we determined that tumors in ERN1Lys^{-/-} mice presented a remarkably lower percentage and density of SA-β-galactosidase-positive TAMs and TANs, as well as a lower density of cancer cells, with respect to the WT under a DIO (**Figure 4G-H, Supplementary Figure S4B**).

Overall, these data support the idea that IRE1α-mediated ER stress in myeloid stress contributes to cancer cell senescence during obesity.

DISCUSSION

The presented results unravel a new role of TLR4 in a context of tumorigenesis during obesity. Experimentally, we show that low immunogenic tumors necessitate TLR4 to engage with cancer cellular senescence and exacerbate tumorigenesis during obesity. Furthermore, we identified that the innate immune system, and more particularly TAMs, play a pro-tumorigenic role in this context

via IRE1 α -mediated ER stress. Importantly, we show that in absence of myeloid-specific IRE1 α expression, tumors do not thrive during obesity, and do not engage with pathways of cellular senescence.

Among the multiple challenges in diagnosing cancer, the profiling of tumor immunogenicity is not an easy one. The contribution of both innate and adaptive immune response to tumor growth relies on a dynamic chain of events hard to grade, especially under variable circumstances such as the degree of obesity and body adiposity [4, 43, 54-57]. The immunogenicity relative to the cancer cell lines investigated in the present study have been previously characterized in-depth regarding their immunogenicity [58-62]. This enabled us to dissect how a diet rich in fat can favor tumorigenesis when tumors are poorly immunogenic, and how TLR4 signaling is implicated. While TLR4 agonists increase effector T cells recruitment, they also induce PD-L1 mediated immune evasion [18, 19]. This might explain why highly immunogenic xenografts, such as MC-38 or mildly immunogenic xenograft, such as B16-F10 tumors, were unaffected by the lack of host TLR4 expression [58-62]. Interestingly, we have also previously reported that these tumors do not show signs of cellular senescence and that were resistant to senolysis (Fournier *et al.* unpublished but submitted with this thesis). These observations suggest that a low immunogenic profile, such as the one in LLC tumors, may drive a different pro-tumoral response in consequence to a high caloric diet, and that this process may be mediated through myeloid-specific TLR4/IRE1 α signaling.

The implication of IRE1 α to TLR4 activation during inflammation is not a new concept [63-66]. More particularly in obesity, deletion of TLR4 proved to protect from ER stress in liver, muscle and adipose tissue of mice fed with high-fat diet [67]. Moreover, several studies support the notion that the activation of TLRs and increase of ER stress are joint mechanisms that link obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [68-71].

IRE1 α can act as an immunosuppressive mediator shaping the immunogenic response against cancer cells (Reviewed in [72, 73]). Furthermore, anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-6 and IL-10 trigger IRE1 α activation in myeloid cells [74], which, in turn, induces PGE2 expression to elicit immune tolerance and promote malignant progression [75]. Interestingly, in TLR4-activated macrophages, the IRE1 α /XBP1s signaling regulates the inflammatory response [63-65, 76]. It is of relevance that this same IRE1 α /XBP1s axis can also induce cellular senescence after an

oncogenic stress [77-79]. Despite evidencing the pivotal role of TLR4 in the myeloid lineage, our TLR4 knock-out model was not specific to immune cells alone. Nevertheless, we were able to demonstrate that TLR4/IRE1 α signaling in myeloid cells was dictating tumor senescence and ensuring tumor development by means of a myeloid specific IRE1 α knock-out model.

The present work also highlights some relevant translational implications of TLR4 in cancer during obesity. The overexpression of TLR4 in tumors of patients with high BMI (>35) matched with our previously reported data on expression of markers of cellular senescence p16^{INK4A} and PAI-1 in the same cohort of obese patients with metastasis (Fournier *et al.*, unpublished but submitted in this thesis). Of note, the patients enrolled in our study had mostly low responses to chemotherapy treatments, as highlighted by moderate Rubbia Brandt scores, explaining the low immunogenic nature of the tumor and metastatic tissue analyzed. Interestingly, our sampling showed an increase in chemotherapeutic response among lean patients while obese patients were mostly resistant to treatment, as shown with the evaluation of the pathologic response to chemotherapy (Blazer).

This study provides evidence that DIO elicits an IRE1 α -mediated ER stress response in myeloid cells, and that this is accompanied by cellular senescence in a TLR4-dependent manner. We demonstrate that TLR4 participates in tumoral senescence during experimental obesity while studying multiple cancer cell lines of variable degree of immunogenicity *in vivo*. The one study that showed that chemically-induced hepatocellular carcinoma depends on SASP, proved that TLR4 was not necessary to achieve tumor development in obese mice. However, this cancer model presented a highly mutagenic, thus immunogenic, tumoral profile [80]. Hence our data represents an important landmark in cancer research as we dissected the necessity of having low immunogenicity in tumors in order to engage with pathways of cellular senescence, and that TLR4 is pivotal for these series of events to happen.

METHODS

Histological preparation of human CRC metastasis in liver biopsies

Histological samples were obtained through a collaboration with Dr Simon Turcotte, the Investigator in charge of the colorectal, hepatobiliary, and pancreatic cancers biobank of the RRCancer (CRCHUM). Lean (BMI<25) and obese (BMI>35) patient samples were embedded in paraffin and cut at 5µm. The samples were kept at room temperature in a locked cabinet. To prepare samples for immuno-detection, slides were heated on a thermo-block for 5min at 100°C before being deparaffinized in xylenes solution. Samples were then hydrated and boiled for 10min in a citrate buffer to optimize antigen retrieval.

TLR4 immuno-peroxidase detection in human biopsies

Immuno-peroxidase detection was performed following manufacturer's instructions (Abcam). In brief, a TLR4 antibody was incubated in blocking solution overnight and were detected using a biotinylated goat anti-polyvalent secondary antibody, a streptavidin peroxidase solution, and a DAB chromogen. Samples were thoroughly washed with tap water, dehydrated using increased concentration of anhydrous buffers and mounted prior to visualisation on a Zeiss Axio Imager.

Animal models

C57BL/6J and LysMCre [*Lyz2^{tm1(cre)lfo}/J*] WT mice and B6.B10ScN-*Tlr4^{lps-del}/JthJ* (referred in this paper as *Tlr4^{-/-}*) mice were purchased from the Jackson Laboratory and bred in house. B6.Cg-*Gt(ROSA)26Sor^{tm3(CAG-EYFP)Hze/J}* mice were also purchased from the Jackson Laboratory and we generated in-house the *Ern1Lys^{-/-}* and the LysM-Cre/ROSA26EYFP^{fl/fl} mice (referred in this paper as R26R-EYFP), with EYFP-expressing cells of myeloid lineage to track these cells in mice. All strains were bred in the institute's animal facility and kept in 12h-12h light & dark cycles with free access to water and food. Animals were assigned to the different experimental groups in a randomized fashion.

Diet-induced obesity (DIO) model

One month prior to tumor inoculation, all 8-week-old animals were randomly subjected to either a DIO (60% lipids) or a control nutritionally matched regular diet (10% lipids). Both diets were purchased from Research Diet (See **Supplementary Table S1**). Animal weights were monitored

weekly throughout the duration of the experiment using a digital balance and left on diet until sacrifice.

Generation of transgenic LLC^{LUC-mCherry} and *in vivo* luciferase activity monitoring

LLC cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin–streptomycin. A transgene was generated via the retroviral infection of the MSCV-LUC-IRES-mCherry plasmid (referred in this paper as LLC^{LUC-mCherry}) as described before ([81]; Fournier *et al*, unpublished but submitted in this thesis). Luciferase activity of these cells was also confirmed using an IVIS (Fournier *et al*, unpublished but submitted in this thesis). The expression of mCherry was maintained after 3 passages of the infected LLC cells (88,3% positive) demonstrating the stability of its expression over time. We also showed that the cell cycle status (PI) and BrdU incorporation were not affected by the transduction (Fournier *et al.*, unpublished but submitted in this thesis).

Transgenic cells were isolated using the mCherry tag and luciferase assays were performed following manufacturer's recommendations. In brief, 150mg of D-Luciferine potassium salt per kg of animal was intra-peritoneally (IP) injected 10 minutes prior to the imaging using an *In Vivo Imaging System* (IVIS; IVIS Lumina) and animals were kept anaesthetized while imaging. Luciferase activity was analyzed according to radiance (photon/second/cm²/steradian). Tumor growth was followed at different time-points (3, 5, 7, 10, 12, and 14 days after inoculation). This strategy allowed us to monitor tumor growth using the luciferase activity of the LLC cells in all mice strains.

Syngeneic tumor inoculation and volumetric monitoring

To initiate tumors, we inoculated cancer cells in 12 weeks old animals by subcutaneously injecting 5×10^5 LLC cells, 5×10^5 B16-F10 cells or 5×10^5 MC-38 cells in 100 μ L of PBS 1X. These cells are from C57BL/6J origin, which has the advantage of being immunologically compatible with our mice strains. Tumor growth was followed at different time-points by means of caliper for volumetric measures (7, 10, 12, and 14 days after inoculation) *in vivo*. Tumor volume was calculated with the following formula: $\text{volume} = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$. Mice reaching predetermined endpoints (tumor volume reaching 500 mm³ or a significant tumor ulceration or weight loss (>20%)) were euthanized and excluded from further analysis. Tissues of interest were collected and processed for further analysis at the endpoint of experiments.

Tumor microenvironment characterization with FACS

Tumors from WT (C57BL/6J or LysMCre) or KO (*Tlr4*^{-/-} or *Ern1Lys*^{-/-}) mice were collected in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and homogenized in a solution of 500U/mL Collagenase IV, 10µg/mL Liberase TL and 100U/mL DNase I for 30 minutes at 37°C with gentle shaking every 5 minutes. Homogenates were then filtered with a 70-µm-cell strainer and washed in PBS supplemented with 10% FBS. Samples were then subjected to 1X RBC Lysis Buffer for 5 minutes and the remaining cells were resuspended in PBS1X for zombie aqua viability staining for 15 minutes at room temperature. Cell suspensions were then incubated with LEAF purified anti-mouse CD16/32 for 10 minutes at 4°C to block Fc receptors. Cells were then incubated for 25 minutes at 4°C with wanted mixes of the following antibodies (all detailed in **Supplementary Table S2**): Alexa Fluor® 700 anti-mouse CD45.2, Brilliant Violet 711™ anti-mouse/human CD11b, PE/CY7 anti-mouse F4/80, APC/CY7 anti-mouse Ly6G, Brilliant Violet 785™ anti-mouse CD11c, APC anti-mouse CD64, APC anti-mouse CD31. Macrophages, neutrophils, and endothelial cells were gated as: Macrophages (*Zombie*⁻, CD45.2⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻, CD11c^{-low} (to discriminate DCs), F4/80^{high}, CD64⁺), Neutrophils (*Zombie*⁻, CD45.2⁺, CD11b⁺, Ly-6G^{high}) and endothelial cells (*Zombie*⁻, CD45.2⁻, CD31⁺). In addition, LLC cells were detected by their endogenous mCherry expression. FACS was performed on a Fortessa X20 device with Diva software and data were analyzed using FlowJo Software.

Transcriptomic sequencing analysis of sorted myeloid cells from tumor and bone marrow

Tumors from R26R-EYFP mice were dissected and homogenized as mentioned above. Using a FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences) device, we isolated cells of the myeloid lineage using their EYFP protein expression. Myeloid cells were collected in pure FBS and centrifuged prior to their resuspension in RLT buffer from Rneasy Mini kit for RNA extraction. QIAshredder homogenizers were used to homogenize cells.

For bone marrow myeloid cells, R26R-EYFP donor mice were sacrificed and leg bones were dissected. Femur and tibia cavities were flushed with PBS supplemented with 5% FBS using a syringe, resuspended, and passed through 70-µm strainer. Red blood cells were removed using RBC Lysis buffer. EYFP-myeloid cells were collected as described above for tumor-associated myeloid cells.

Gene-level expression was obtained using the Ion AmpliSeq Transcriptome Mouse Gene Expression Kit (Thermo Fisher Scientific) on an Ion Proton sequencer (Thermo Fisher Scientific). Briefly, 50ng of total RNA was reversed transcribed using the SuperScript VILO cDNA synthesis kit and then simultaneous targeted amplification of known RefSeq genes was performed using the Ion AmpliSeq Transcriptome Mouse Gene Expression Core Panel following recommended protocol. Transcriptome analysis was performed using Ion Torrent Suite and the ampliSeqRNA plugins.

Secondary analysis was performed using DESeq2, GSVA and GSEA. GSEA was used to validate the correlation between transcriptomic signatures and the phenotype of interest. Enrichment analysis was conducted on pre-ranked lists based on shrunken log₂ fold changes from DESeq2 lfcShrink option with the enrichment score calculate using the default weighted p=1 parameter. Gene sets used were obtained from publicly available resources and are referenced in the **Supplementary Table S1**. The Ampli-Seq data generated in this study will be published in a repository upon publication of this paper.

Quantitative PCR analysis of tumor lysates

RNA extraction was performed with 100 to 500mg of frozen tissues (-80°C) after the TRIzol Reagent Protocol. 1 µg of RNA was reverse-transcribed according to the manufacturer's instructions (Applied Biological Materials Inc.). The qPCR experiments were performed using BrightGreen 2X, 250nM of primer mix (1:1), and 40ng of complementary DNA per reaction (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Expression levels of *Actb* were used to normalize the expression of the different genes. All primers used are listed in **Supplementary Table S3**.

Histological analysis of senescence-associated β-Galactosidase activity in tumors

SA-β-gal activity assays were carried out as previously described [82]. 20µm tissue sections were incubated in an MgCl₂, pH5.0 buffer overnight at 4°C. The buffer was replaced by an X-Gal staining solution (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) (1 mg/mL X-Gal, 1mM MgCl₂, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆) in PBS 1X, pH5.0 for 6 hours at 37°C. All tumor cross-sections from the same batch were assessed at the same time. The reaction was stopped with 4 washes of PBS1X and imaged immediately using an epifluorescence microscope (DIC; Zeiss Axio Imager).

Quantification of SA- β -gal activity was all carried the same way. We quantified full tumor sections images using the ImageJ software. Positive regions (Blue) were normalized on total tumor area for each sample. The results are expressed as positive area on total area.

Single-cell analysis of senescence-associated β -Galactosidase activity in tumors

The *in vitro* protocol for the detection of SA- β -gal⁺ cells using 5-Dodecanoylaminofluorescein di- β -D-Galactopyranoside (C₁₂FDG) published in Nature Protocol [83] was adapted for the single cell detection of SA- β -gal⁺ cells in our *in vivo* settings. We dissected and homogenized tumors as well as gated the cells using the same strategies as mentioned before to identify macrophages, neutrophils, endothelial cells, and cancer cells from the TME. Then, we increased the internal pH of lysosomes to an expected pH5 using bafilomycin A1. Following an hour incubation of 100 μ M bafilomycin A1 (37°C; 5% CO₂), 2 μ M of C₁₂FDG, a β -galactosidase substrate emitting green fluorescence following the enzymatic reaction, was added to the sample for 20 minutes (37°C; 5% CO₂). We detected SA- β -gal⁺ cells FACS on a Fortessa X20 (BD Biosciences) device. Data were further analyzed using the FlowJo software.

Immunoblotting

Protein extraction from tumors was performed with 100-500 mg of frozen tissues (-80°C). Tissue was homogenized in lysis buffer (150mM NaCl, 1%NP40, 0,5%DOC, 50mM Tris pH8,9) followed by the addition of the 2X detergent buffer (150mM NaCl, 2%NP40, 1%DOC, 0,2% SDS, 50mM Tris pH8,9) to the samples. Both buffers were supplemented with phosphatase (1:100) and protease (1:500) inhibitors. Protein extraction was also performed on cell-sorted cells. Using a FACS Aria III Cell Sorter (BD Biosciences) device, we extracted CD45.2⁺CD11b⁺Ly6G⁻CD11c^{low}F4/80^{high}CD64⁺ cells (TAMs) and mCherry⁺ cells (LLC cells) from either WT or *Tlr4*^{-/-} animals as well as EYFP⁺ cells and mCherry⁺ cells (LLC cells) from R26R-EYFP animals. The extraction method consists, this time, of cell lysis in RIPA 1X buffer (150mM NaCl, 1%NP40, 0,5%DOC, 0,1% SDS, 50mM Tris pH8,9), supplemented with phosphatase and protease inhibitors, followed by a freeze and thaw cycle. Protein concentration from homogenate and cell lysates was assessed using a QuantiPro BCA Assay Kit and wanted amount of protein (10-50 μ g) was analyzed for each condition by standard SDS-PAGE technique. All primary antibodies are listed in **Supplementary Table S2**.

Western blots quantification was all carried the same way. We quantified western blots images using the ImageJ software (Mean gray area) for each analysed protein. Every sample (band) on a particular membrane was normalized to its own reference protein signal (β -actin). Every replicate (n) is relative signal to the mean of the control signals of a particular experiment.

Analysis of the cell cycle in tumors

We dissected and homogenized tumors as mentioned above. Then, we analyzed the cycle state of cancer cells (mCherry⁺) using DAPI (75 μ M) as previously described (G0/G1=2n, S=2n~4n, and G2/M=4n) [84]. Samples were permeabilized and fixed following the manufacturer's instructions (Cytofix/Cytoperm kit). The day of the acquisition at the Fortessa X20 device (BD Biosciences), we thawed cells and performed the DAPI staining right before the FACS acquisition.

XBPI splicing analysis in tumors

As for qPCR experiments, RNA extraction was performed with 100 to 500mg of frozen tissues (-80°C) after the TRIzol Reagent Protocol and 1 μ g of RNA was then reverse-transcribed according to the manufacturer's instructions (Applied Biological Materials Inc.). Coding DNA was amplified for XBPI by a PCR reaction. XBPI primers are listed in **Supplementary Table S3**. Amplified DNA was then digested using the *Pst* I digestion enzyme for 5 hours at 37°C and loaded on an 1.5% agarose gel. Splicing of XBPI was quantified using the ImageJ software (Mean gray area). The intensity of the spliced signal (upper band) was normalized on the intensity of the unspliced signal (lower bands) as described before [85]. Every replicate (n) is presented as a relative signal to the mean of the RD-WT signals of the same experiment.

Statistical analysis

All experiments were performed at least 2-3 times. Data are presented as mean \pm SEM. P values were considered significant when $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) or $p < 0,001$ (***). All outliers are determined with the ROUT method (Q=1,0%). The number of minimum biological replicates (n) for consistent results was established based on previous experiments and existing literature references. At least 4 biological replicates were used for each biochemical experiment (*ex vivo*, *in vitro*), 7 to 11 biological replicates per group were used for animal studies (*in vivo*) and 4 patient samples were used for TLR4 assessment in tumor histology sections. N are indicated in figure legends for each experiment.

Material and Data Availability

All materials as well as data used in this project are pertinently referenced in the key resource table (**Supplementary Table S1**). Further information and requests for resources, reagents, materials, or data should be directed upon reasonable request to the corresponding author, Przemyslaw Sapieha (mike.sapieha@umontreal.ca).

Study approval

All studies were approved by the Animal Care Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center in agreement with the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FF, SC-G and PS conceived and designed the experiments. FF and SC-G conducted the animal experiments. FF, FP, and RJ conducted the FACS experiments. FF, RJ, and VG conducted qPCR experiments. FF and MB generated and analyzed the Ampli-Seq data. FF, SC-G, and PS provided significant input and wrote the manuscript. FF and SC-G designed the figures. All co-authors reviewed the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

PS holds the Wolfe Professorship in Translational Research and a Canada Research Chair in Retinal Cell Biology. This work was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (Foundation grant #148460) and the Canadian Diabetes Association (DI-3-18-5444-PS). SC-G Holds a scholarship from the Fonds de la Recherche du Québec en Santé (FRQS). We thank Simon Turcotte and Louise Rousseau for providing human samples through the RRCancer Biobank (Montréal), Randall J. Kaufman for kindly providing the *ERNILys^{-/-}* mice (Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute), Mikhail Sergeev (CR-HMR) for support with microscope, Claire Viallard (CR-HMR) for teaching the inoculation of LLC, Christopher Rudd (CR-HMR) for kindly providing MC-38 and B16-F10 cancer cell lines and the animal facility assistants for managing the colony at the Hospital Maisonneuve-Rosemont Research Center.

FOOTNOTES

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

TABLES AND FIGURES

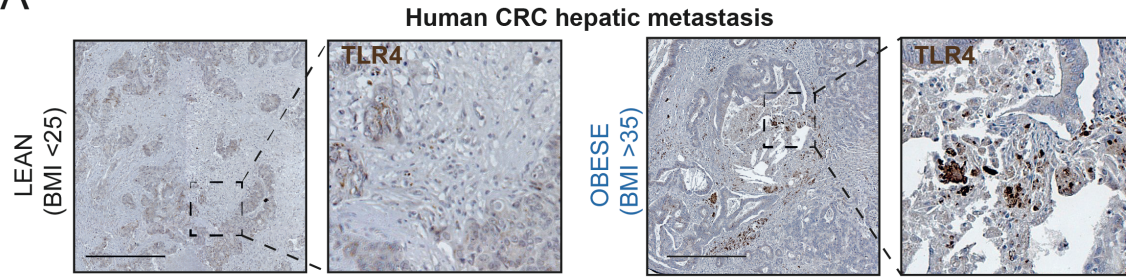
Tableau 6. – Article 2 - Table 1. Clinical data related to tumors analyzed in the study

Patient	BMI	Sex	Age	Rubbia Brandt	Blazer	# Lesions	Tumor (cm)	TLR4 score
Lean 1	18.9	M	65	4	minor	1	3.2	+
Lean 2	15.7	F	56	3	major	1	2.5	++
Lean 3*	20.0	M	77	4	minor	2	4.8	–
Lean 4	18.2	M	64	3	major	2	0.6	–
Obese 1	45.6	M	68	4	minor	1	1.5	++
Obese 2*	41.4	F	66	4	minor	3	4.0	+++
Obese 3	44.4	M	74	no data	no data	1	3.5	+++
Obese 4	35.1	M	67	4	minor	3	2.5	++

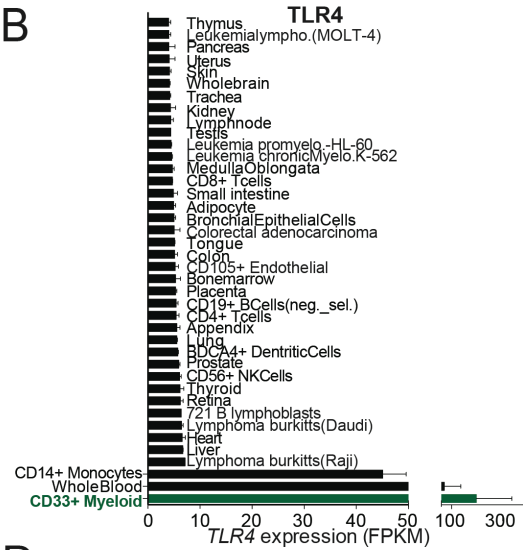
*Representative images depicted in Figure 1A

Figure 1

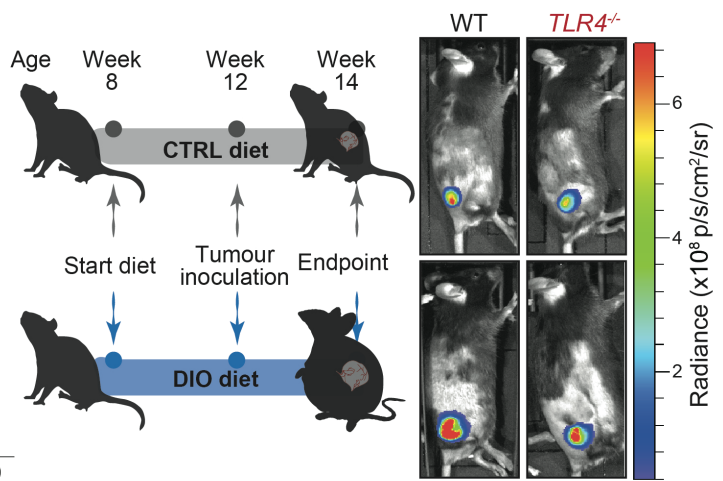
A



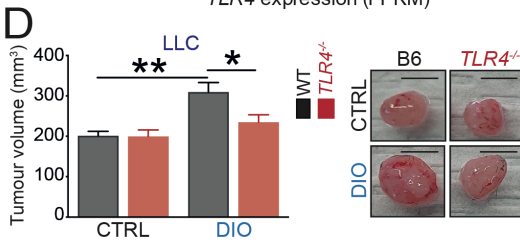
B



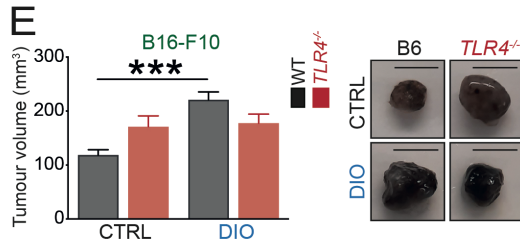
C



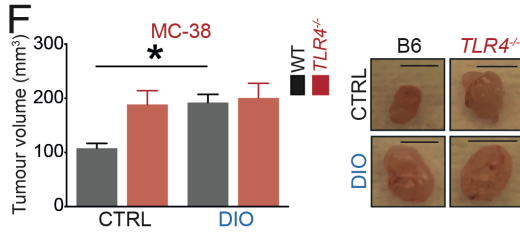
D



E



F



G

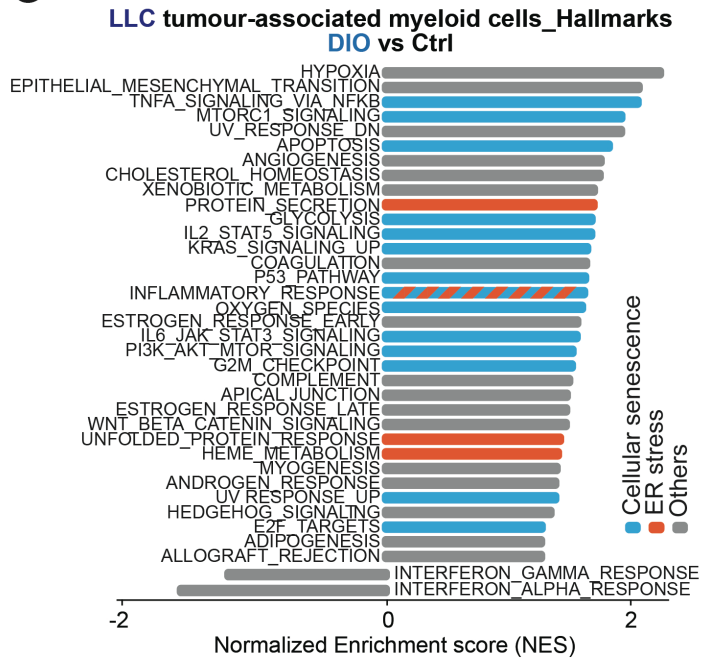


Figure 14. – Article 2 - Figure 1. TLR4 participates of tumorigenesis during high body adiposity conditions

(A) Representative immuno-peroxidase images showing TLR4 (in brown), and hematoxylin (in purple) in lean and obese patients. (Scale bar = 500 μ m). (B) *TLR4* gene expression analysis in human tissues from the *BioGPS* database, represented as *TLR4* average expression for each tissue. A.U. means arbitrary units. (C) Schematic representation of the experimental paradigm combining DIO and LLC cells inoculation in *TLR4*^{-/-} and WT mice. Representative images of tumors *in vivo* 14-days post-inoculation of LLC cells obtained with *IVIS*. Images overlay the luminescent signals and are represented as radiance (p/s/cm²/sr). Imaging thresholds were optimized for minimizing inter-batch variation (min: 3.85e7; max:6.90e8). (D-F) Tumor volume 14 days post-inoculation of (D) LLC, (E) B16-F10 and (F) MC-38 tumors from DIO and CTRL *TLR4*^{-/-} and WT mice represented as bar charts and representative images. (G) Ampli-Seq analysis of tumor-associated myeloid cells from HFD and RD control tumors (n=3). Hallmark GSEA list of pathways is represented as NES (FDR q-value threshold=0,1). Hallmark pathways highlighted are associated with cellular senescence (pale blue) and ER stress (orange).

Human data represent 4 independent samples. Tumor monitoring data represent ≥ 3 independent experiments with $n \geq 7$ biological replicates.

Statistics: (D-F) One-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001; 95% CI. Error bars represent mean \pm SEM. Each *n* in bar charts represents biological replicates.

Figure 2

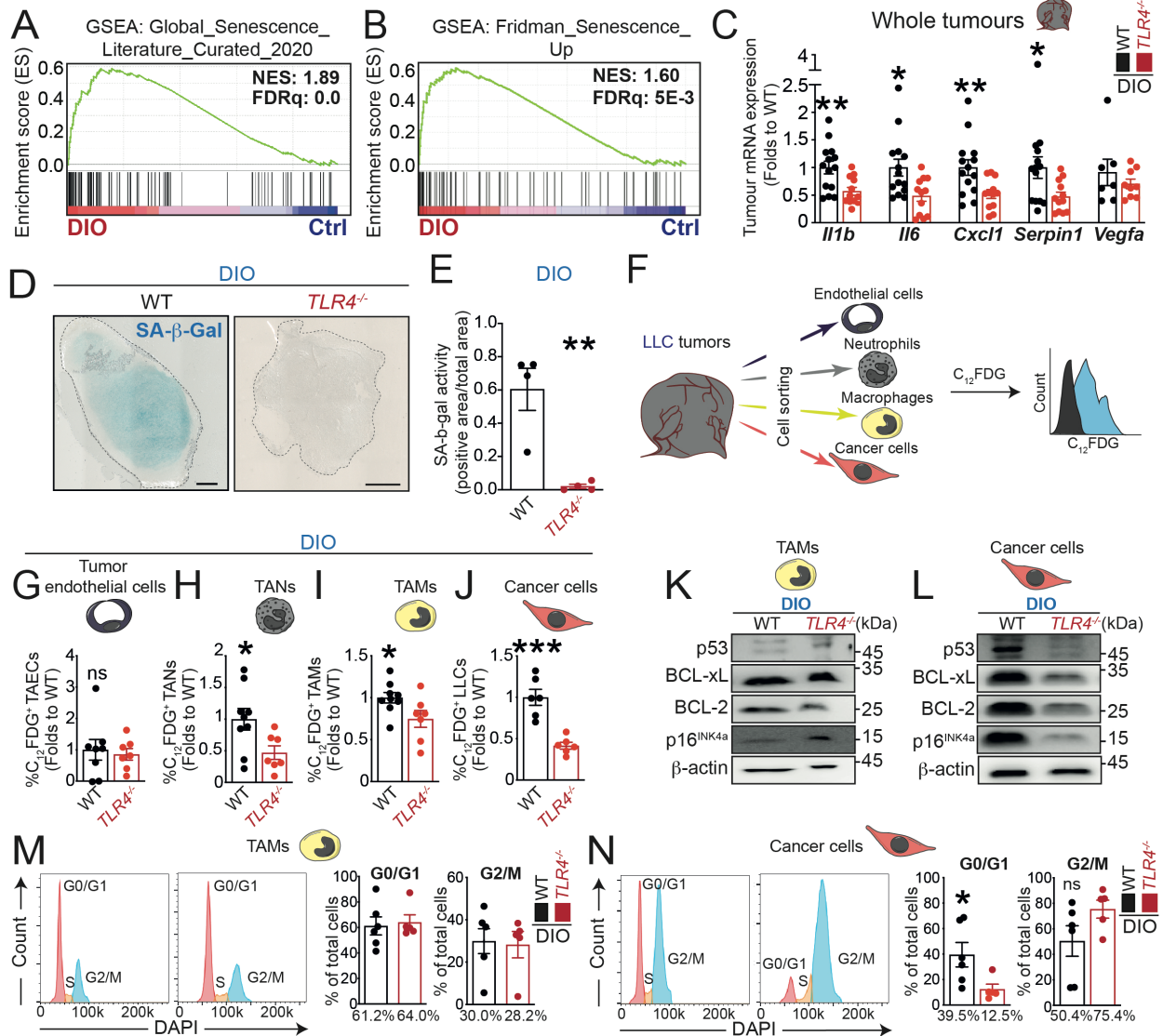


Figure 15. – Article 2 - Figure 2. Host expression of TLR4 dictates cancer cell senescence in the tumor under the influence of a chronic inflammatory milieu

(A-B) GSEA analyses of (A) Global_Senescence_Literature_Curated_2020 and (B) Fridman_Senescence_UP genesets for tumor-associated myeloid cells (n=3). (C) Bar charts represent analysis of SASP-related factors using mRNA expression of *Il1b*, *Il6*, *Cxcl1*, *Serpin1*, and *Vegfa* in whole tumor lysates. (D-E) (D) Representative images and (E) quantification of senescence-associated-β-galactosidase activity (SA-β-Gal) in tumor cross sections (Scale bar = 1000μm). (F) Schematic representation of the experimental strategy for the detection of SA-β-Gal activity at the single cell level using C₁₂FDG. (G-J) Senescence-associated β-galactosidase

activity analysis at a single cell level for (G) endothelial cells, (H) TANs, (I) TAMs, and (J) cancer cells represented as the relative number of $C_{12}FDG^+$ cells to total cells of a given cell type. (K-L) Analysis of p53, BCL-xL, BCL-2, and p16^{INK4a} protein expression in sorted (K) TAMs and (L) cancer cells by means of WB. (M-N) Representative histograms and bar charts depicting the cell cycle state of (M) TAMs and (N) cancer cells within the TME. Percentages indicate proportions of cells in the G0/G1 or the G2/M phase to total number of cells.

Senescence-associated β -galactosidase activity data represent 2 independent experiments with ≥ 4 biological replicates. WB data represent WB data represent 2 independent experiments with ≥ 5 independent biological replicates.

Statistics: (C, E, G-J, M-N) Two-tailed unpaired Student's *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. Error bars represent mean \pm SEM. Each *n* in bar charts represents biological replicates.

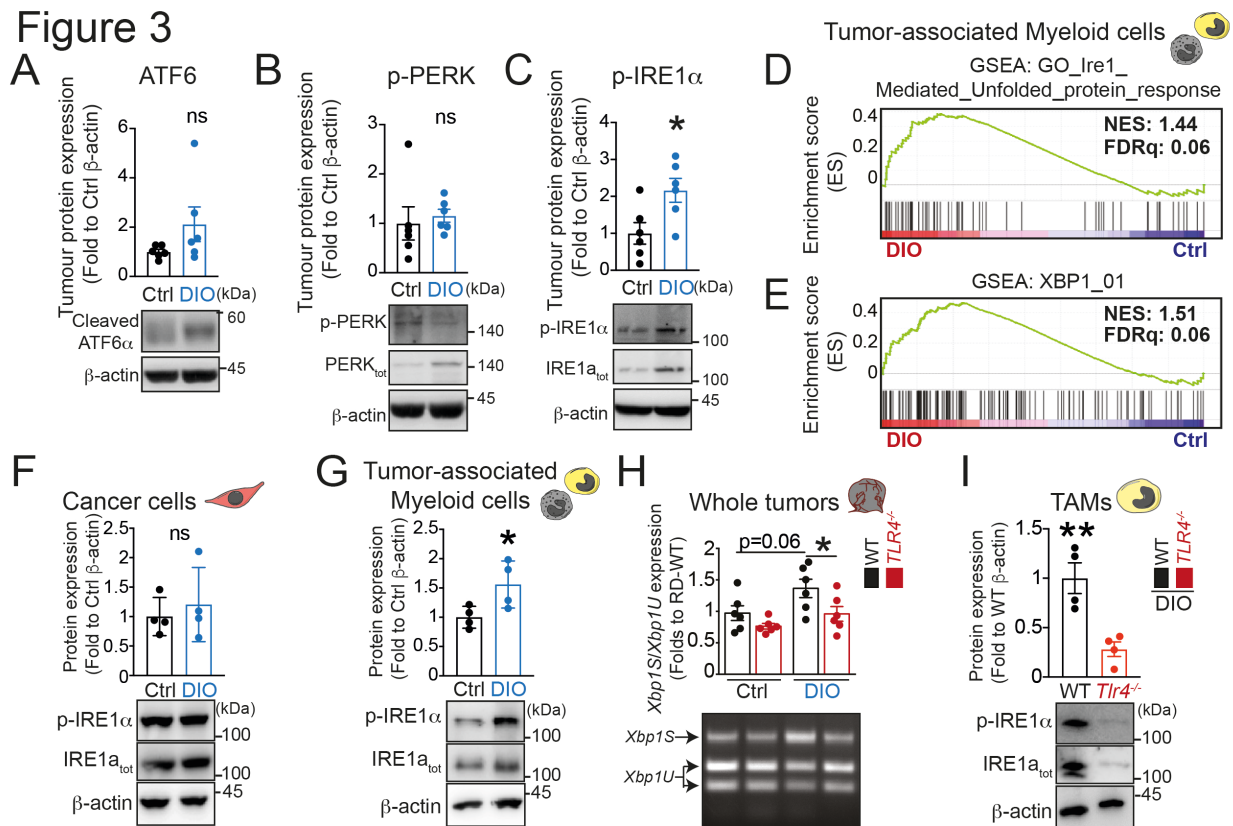


Figure 16. – Article 2 - Figure 3. TLR4 elicit IRE1 α -driven ER stress in myeloid cells associated to the tumor

(A-C) Analysis of **(A)** ATF-6, **(B)** p-PERK, and **(C)** p-IRE1 α protein expression in whole tumors of DIO and control mice. **(D-E)** GSEA analyses of **(D)** GO_Ire1_Mediated_Unfolded_protein-response and **(E)** XBP1_01 genesets for tumor-associated myeloid cells (n=3). **(F-G)** Analysis of p-IRE1 α protein expression in **(F)** cancer cells and **(G)** tumor-associated myeloid cells of DIO and control mice by means of WB. **(H)** Analysis of XBP1 splicing in whole LLC tumors by means of PCR. **(I)** Analysis of p-IRE1 α protein expression in TAMs of *TLR4*^{-/-} and WT mice subjected to a DIO by means of WB.

Statistics: **(A-C, F-G, I)** Two-tailed unpaired Student's *t* test. **(H)** One-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001. Error bars represent mean \pm SEM. Each *n* in bar charts represents biological replicates.

Figure 4

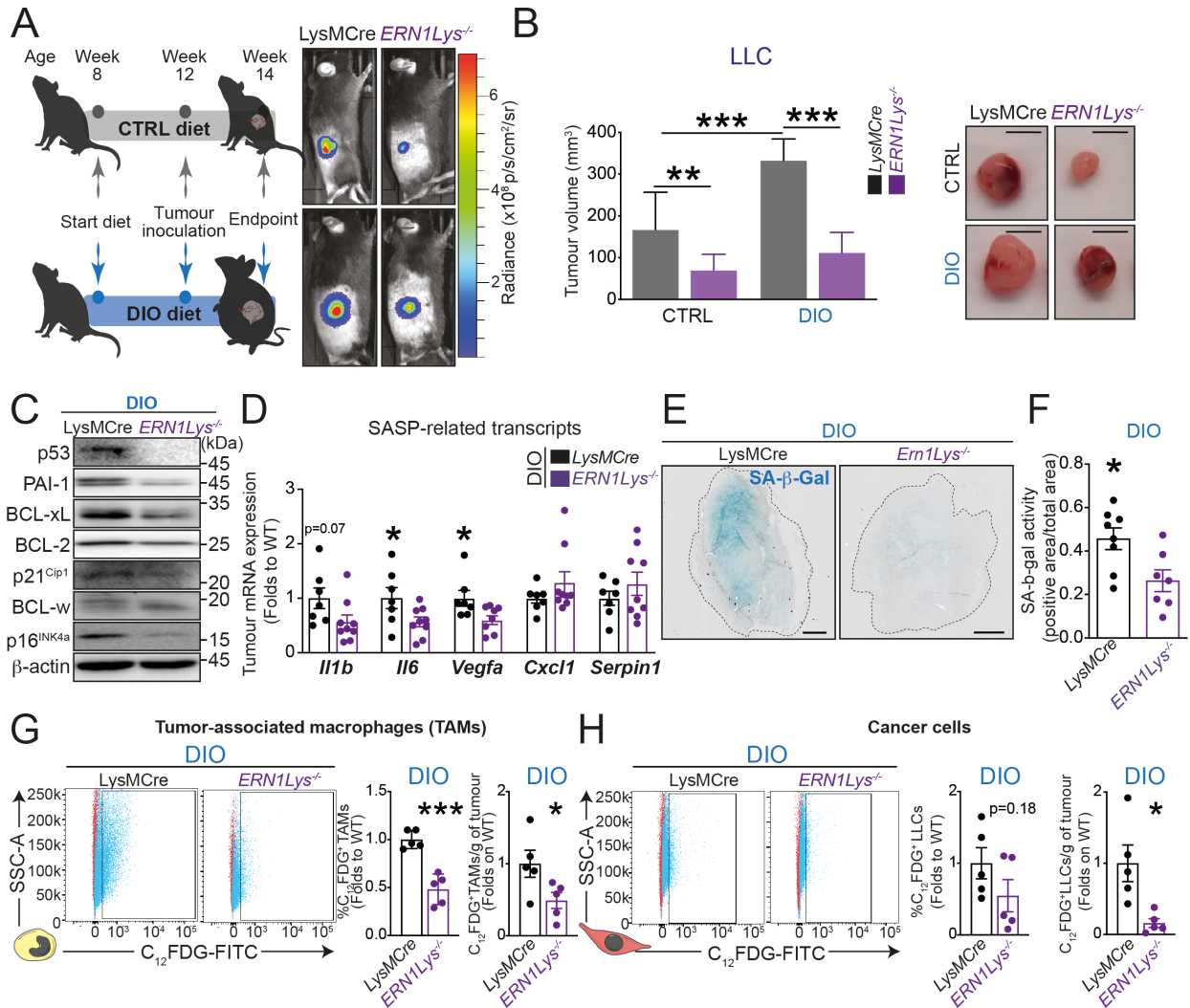


Figure 17. – Article 2 - Figure 4. Myeloid-specific IRE1 α impacts tumorigenesis and cellular senescence during DIO

(A) Schematic representation of the experimental paradigm combining DIO and LLC cells inoculation in ERN1Lys^{-/-} and WT mice. Representative images of tumors *in vivo* 14-days post-inoculation of LLC cells obtained with *IVIS*. Images overlay the luminescent signals and are represented as radiance (p/s/cm²/sr). Imaging thresholds were optimized for minimizing inter-batch variation (min: 1.68e7; max:6.17e8). (B) Tumor volume 14 days post-inoculation of LLC from DIO and CTRL ERN1Lys^{-/-} and WT mice represented as bar charts and representative images. (C) Analysis of senescence markers p53, PAI-1, BCL-xL, BCL-2, p21^{Cip}, BCL-w, and p16^{Ink4a} protein expression in whole LLC tumors of ERN1Lys^{-/-} and WT mice subjected to a DIO by means

of WB. **(E-F)** **(E)** Representative images and **(F)** quantification of senescence-associated- β -galactosidase activity (SA- β -Gal) on tumor cross sections (Scale bar = 1000 μ m). **(G-J)** Representative histograms and senescence-associated β -galactosidase activity analysis at a single cell level for **(G)** TAMs and **(H)** cancer cells represented as the relative number of C₁₂FDG⁺ cells to total cells of a given cell type and C₁₂FDG⁺ cells of a given cell type per gram of tumor.

Tumor monitoring data represent 3 independent experiments with $n \geq 9$ biological replicates. WB data represent 2 independent experiments with $n \geq 5$ biological replicates.

Statistics: **(B)** One-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. **(D, G, H)** Two-tailed unpaired Student's *t* test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Error bars represent mean \pm SEM. Each *n* in bar charts represents biological replicates.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figures

- Supplementary Figure S1. Related to Figure 1, TLR4 participates of tumorigenesis during high body adiposity conditions
- Supplementary Figure S2. Related to Figure 2, Host expression of TLR4 dictates cancer cell senescence in the tumor under the influence of a chronic inflammatory milieu
- Supplementary Figure S3. Related to Figure 3, TLR4 elicit IRE1 α -driven ER stress in myeloid cells associated to the tumor
- Supplementary Figure S4. Related to Figure 4, Myeloid-specific IRE1 α impacts to tumorigenesis and cellular senescence during DIO

Supplementary Tables

- Supplementary Table S1. Key resources related to the Methods
- Supplementary Table S2. Primary antibodies
- Supplementary Table S3. Primer sequences

SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1

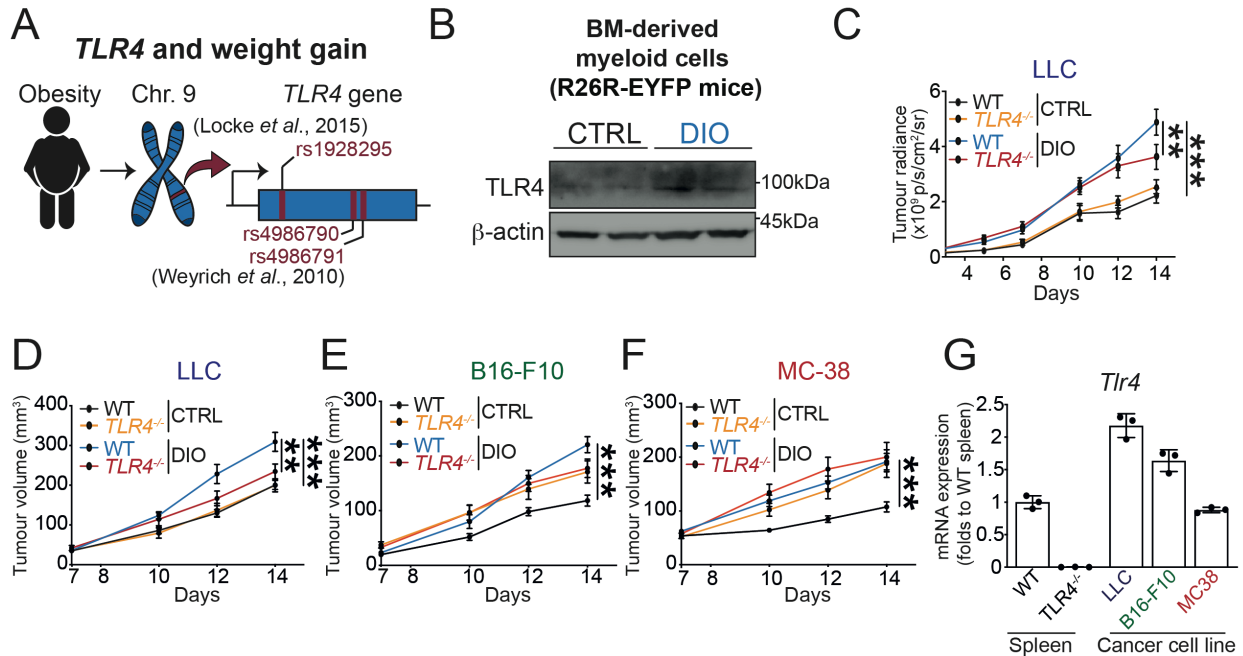


Figure 18. – Article 2 - Supplementary Figure S1. Related to Figure 1, TLR4 participates in tumorigenesis during high body adiposity conditions

(A) Schematic representation of the positive correlation between several *TLR4* polymorphisms (rs1928295, rs4986790 and rs4986791) and weight gain in human. (B) *TLR4* protein expression WB analysis in bone-marrow-derived myeloid cells of RD-fed and HFD-fed WT mice. (C) Curve represents LLC tumor growth at each time point using *IVIS*. (D-F) Volumetric analysis of tumor growth, using caliper, of *TLR4*^{-/-} and WT mice under DIO and CTRL-fed mice in the time-course after (D) LLC, (E) B16-F10, or (F) MC-38 inoculation. (G) *Tlr4* mRNA expression qPCR analysis in spleen of WT and *TLR4*^{-/-} mice and LLC, B16-F10, and MC-38 cell lysates.

Tumor monitoring data represent ≥ 3 independent experiments with $n \geq 8$ biological replicates.

Statistics: (C-F) Two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Error bars represent mean \pm SEM. Each n in bar charts represents biological replicates.

Figure S2

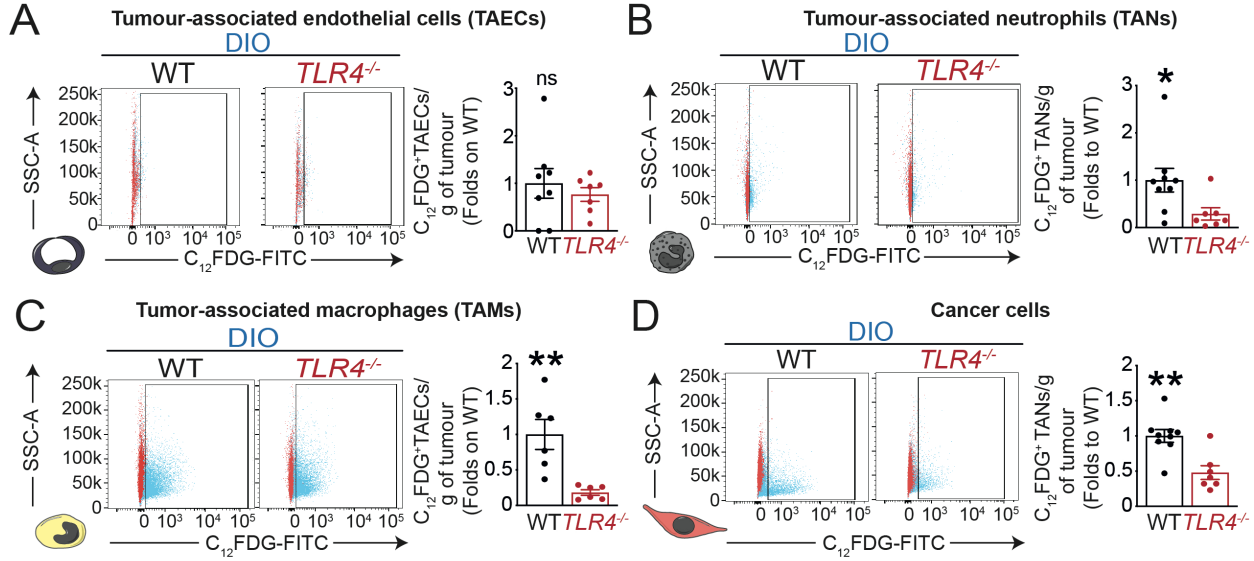


Figure 19. – Article 2 - Supplementary Figure S2. Related to Figure 2, Host expression of TLR4 dictates cancer cell senescence in the tumor under the influence of a chronic inflammatory milieu

(A-D) Representative histogram and senescence-associated β -galactosidase activity analysis at a single cell level for (A) C₁₂FDG⁺ TAECs, (B) C₁₂FDG⁺ TANs, (C) C₁₂FDG⁺ TAMs, and (D) C₁₂FDG⁺ cancer cells. Bar charts represents C₁₂FDG⁺ cells of a given cell type per gram of tumor. Statistics: (A-D) Two-tailed unpaired Student's *t* test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Error bars represent mean \pm SEM. Each *n* in bar charts represents biological replicates.

Figure S3

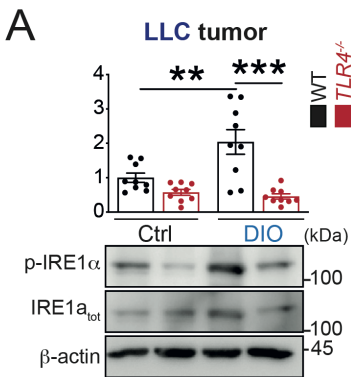


Figure 20. – Article 2 - Supplementary Figure S3. Related to Figure 3, TLR4 elicit IRE1α-driven ER stress in myeloid cells associated to the tumor

(A) Analysis of p-IRE1α protein expression in whole LLC tumor lysates by means of WB.

One-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001. Error bars represent mean ± SEM. Each *n* in bar charts represents biological replicates.

Figure S4

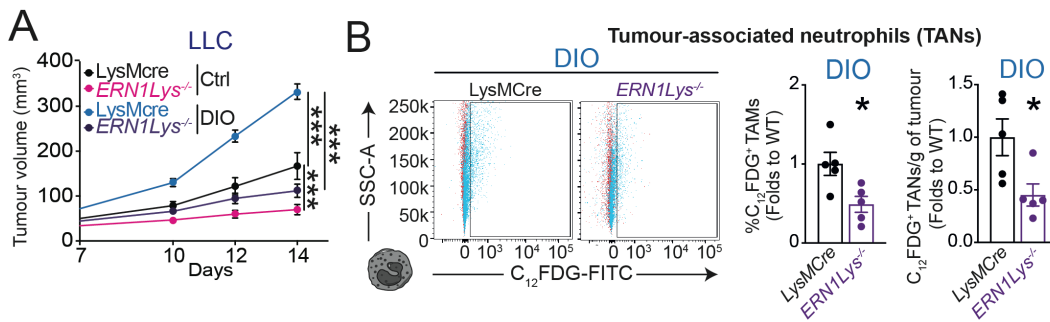


Figure 21. – Article 2 - Supplementary Figure S4. Related to Figure 4, Myeloid-specific IRE1α impacts tumorigenesis and cellular senescence during DIO

(A) Volumetric analysis of LLC tumor growth, using caliper, of *ERN1Lys^{-/-}* and WT mice under DIO and CTRL-fed mice in the time-course. (B) Representative histograms and senescence-associated β-galactosidase activity analysis at a single cell level for TANs represented as the relative number of C₁₂FDG⁺ cells to total cells of a given cell type and C₁₂FDG⁺ cells of a given cell type per gram of tumor.

Tumor monitoring data represent 3 independent experiments with *n*≥9 biological replicates.

Statistics: (A) Two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. (B) Two-tailed unpaired Student's *t* test. *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001. Error bars represent mean ± SEM. Each *n* in bar charts represents biological replicates.

Supplementary tables

Tableau 7. – Article 2 - Supplementary Table S1. Key resources related to the Methods

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Bafilomycin A1	Sigma Aldrich	Cat# B1793
Bright Green 2X	Applied Materials inc. Biological	Cat# MasterMix-ES
C ₁₂ FDG (FITC)	Invitrogen	Cat# D2893
Collagenase IV	Worthington	Cat# LS004188
DAPI	Sigma Aldrich	Cat# D9542
D-Luciferine potassium salt	Perkin Elmer	Cat# 122799
DNaseI	Sigma Aldrich	Cat# D4527
Liberase TL	Sigma Aldrich	Cat#540120001
Phosphatase inhibitor	Sigma Aldrich	Cat# P5726
2-Propanol	Sigma Aldrich	Cat# 650447
Protease inhibitor	Sigma Aldrich	Cat# P8340
RBC Lysis Buffer	Invitrogen	Cat# 00-4333057
TRIzol	Invitrogen	Cat# 15596026
UltraComp eBeads	Invitrogen	Cat# 01-2222-42
X-Gal	BioShop	Cat# XGA00.1
Xylenes	Sigma Aldrich	Cat# 214736
Zombie aqua	Biologend	Cat#423102
Critical Commercial Assays		
Cytofix/Cytoperm kit	Biosciences	Cat# 554714
Mouse & rabbit HRP/DAB (ABC) detection IHC kit	Abcam	ab64264
QIASHredder	Qiagen	Cat# 79654

QuantiPro BCA Assay Kit	Sigma Aldrich	Cat# QBPCA-1KT
RNeasy Mini kit	Qiagen	Cat# 74104
SuperScript VILO cDNA synthesis kit	ThermoFisher Scientific	Cat# 11754050
Deposited Data		
Ampli-Seq Data on tumour-associated myeloid cells	Upon acceptance	Upon acceptance
Experimental Models: Cell Lines		
B16-F10	ATCC	CRL-6475
Lewis Lung Carcinoma (LLC)	ATCC	CRL-1642
Lewis Lung Carcinoma (LLC ^{LUC-mCherry})	This paper	N/A
MC-38	ATCC	
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6J (referred as WT)	Jackson Laboratories	No.000664
Mouse: B6.B10ScN- <i>Tlr4</i> ^{flps-del} /JthJ (referred as <i>Tlr4</i> ^{-/-})	Jackson Laboratories	No.007227
Mouse: <i>Lyz2</i> ^{tm1(cre)lfo} /J (referred as LysMCre)	Jackson Laboratories	No. 004781
Mouse: <i>Ern1</i> <i>Lys</i> ^{-/-}	This paper	Gifted by Kaufmann RJ
Mouse: B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor ^{tm3(CAG-EYFP)Hze} /J	Jackson Laboratories	No. 007903
Mouse: LysM-Cre/ROSA26EYFP ^{fl/fl} mice (referred as R26R-EYFP)	This paper	N/A
Software and Algorithms		
DESeq2 (R)	R project	V3.6.0
Fiji (ImageJ)	https://imagej.net/Fiji	V1.0
FlowJo	https://www.flowjo.com/	V10.2
GraphPad Prism	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/	V8.4.3
GSEA	Broad Institute	V4.0.3
GSVA (R)	R project	V3.6.0
Ion Torrent Suite	Thermo Fisher Scientific	V5.12.0

Living Image	Perkin Elmer (https://www.perkinelmer.com/fr/lab-products-and-services/resources/in-vivo-imaging-software-downloads.html)	V4.7.3
Other		
Database: BioGPS	http://biogps.org/#goto=genereport&id=7099	Last consultation date: April 2022
Geneset: Fridman_Senescence_UP	https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/	Last consultation date: July 2019
Geneset: Global_Senescence_Literature_Curated_2020	Binet F <i>et. al</i> , Science 2020	N/A
Geneset: GO_Ire1_mediated_Unfolded_Protein_Response	https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/	Last consultation date: Dec 2021
Geneset: Hallmarks genesets (H)	https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/	Last consultation date: Dec 2021
Geneset: XBP1_01	https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/	Last consultation date: Dec 2021
Mouse diet: High Fat Diet 60% lipids	Research Diet	Cat#D12492
Mouse diet: Regular Diet 10% lipids	Research Diet	Cat#D12450J

Tableau 8. – Article 2 - Table S2 – Primary antibodies

ANTIBODY	METHOD	CLONE	SPECIE	DILUTION	SOURCE	CAT#
β-ACTIN	WB	N/A	Mouse	1:5000	Cell Signalling	3700S
ATF-6α	WB	N/A	Mouse	1:500	Santa Cruz	sc-166659
BCL-2	WB	N/A	Rabbit	1:1000	Abcam	ab182858
BCL-w	WB	N/A	Goat	1:1000	R&D Systems	AF8241
BCL-xL	WB	N/A	Rabbit	1:1000	Cell Signalling	2764S

C ₁₂ FDG-FITC	FACS	N/A	N/A	2mM	Invitrogen	D2893
CD11B (BV711)	FACS	M1/70	Rat	Titration by lot	Biolegend	101242
CD11C (BV786)	FACS	N418	Armenian Hamster	Titration by lot	Biolegend	117335
CD16/32 (Fc Block)	FACS	93	Rat	1μL/10 ⁶ cells	Biolegend	101330
CD31 (APC)	FACS	MEC 13.3	Rat	Titration by lot	BD Pharmingen	551262
CD45.2 (AlexaFluor700)	FACS	104	Mouse	Titration by lot	Biolegend	109822
CD64 (APC)	FACS	X54-5/7.1	Mouse	Titration by lot	Biolegend	139305
F4/80 (PE/Cy7)	FACS	BM8	Rat	Titration by lot	Biolegend	123114
IgG2 _{aκ} (APC)	FACS	N/A	Rat	Titration by lot	BD Pharmingen	553932
p-IRE1 α _{Ser724}	WB	N/A	Rabbit	1 :1000	Abcam	ab48187
IRE1 α tot	WB	N/A	Rabbit	1 :1000	Cell signaling	3294
Ly-6G (APC/Cy7)	FACS	1A8	Rat	Titration by lot	Biolegend	127624
p16 ^{INK4A}	WB	N/A	Rabbit	1:500	Abcam	ab211542
p21 ^{Cip1}	WB	N/A	Rabbit	1:500	Abcam	ab109199
p53	WB	N/A	Rabbit	1:1000	Abcam	ab131442
PAI-1	WB	N/A	Mouse	1:500	Santa Cruz	sc-5297
p-PERK _{Thr980}	WB	N/A	Rabbit	1:500	Cell signaling	3179
PERK tot	WB	N/A	Mouse	1:500	Santa Cruz	sc-377400

TLR4	IHC	N/A	Rabbit	1:1000	Abcam	ab13867
------	-----	-----	--------	--------	-------	---------

Tableau 9. – Article 2 - Supplementary Table S3. Primer sequences

<i>Gene</i>	Primer sequence	
<i>mActb</i>	Forward	GACGGCCAGGTCATCACTATTG
	Reverse	CCACAGGATTCCATAACCAAGA
<i>mCxcl1</i>	Forward	GCTGGGATTCACCTCAAGAA
	Reverse	TGTGGCTATGACTTCGGTTT
<i>mIl1b</i>	Forward	CTGGTACATCAGCACCTCACA
	Reverse	GAGCTCCTTAACATGCCCTG
<i>mIl6</i>	Forward	CTCCATCCAGTTGCCTTC
	Reverse	ATTCCACGATTTCCAGAG
<i>mSerpine1</i>	Forward	TGACGTCGTGGAAGTGC
	Reverse	GAAAGACTTGTGAAGTCGGC
<i>mTlr4</i>	Forward	ATGGAAAAGCCTCGAATCCT
	Reverse	TTTAGGCCCCAGAGTTTTGT
<i>mVegfa</i>	Forward	GCCCTGAGTCAAGAGGACAG
	Reverse	CTCCTAGGCCCTCAGAAGT

<i>mXbp1</i>	Forward	AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC
	Reverse	TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG

REFERENCES

1. Vaure, C. and Y. Liu, *A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 316.
2. Locke, A.E., et al., *Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology*. Nature, 2015. **518**(7538): p. 197-206.
3. Weyrich, P., et al., *The D299G/T399I Toll-like receptor 4 variant associates with body and liver fat: results from the TULIP and METSIM Studies*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13980.
4. Deng, T., et al., *Obesity, Inflammation, and Cancer*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 421-49.
5. Schenk, S., M. Saberi, and J.M. Olefsky, *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 2992-3002.
6. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
7. Ellulu, M.S., et al., *Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications*. Arch Med Sci, 2017. **13**(4): p. 851-863.
8. Rodriguez-Hernandez, H., et al., *Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation*. Int J Endocrinol, 2013. **2013**: p. 678159.
9. Vila, I.K., et al., *Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis*. Cell Rep, 2014. **7**(4): p. 1116-29.
10. Griffin, C., et al., *TLR4, TRIF, and MyD88 are essential for myelopoiesis and CD11c(+) adipose tissue macrophage production in obese mice*. J Biol Chem, 2018. **293**(23): p. 8775-8786.
11. Orr, J.S., et al., *Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2718-27.
12. Milanski, M., et al., *Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity*. J Neurosci, 2009. **29**(2): p. 359-70.
13. Baffy, G., *Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view*. J Hepatol, 2009. **51**(1): p. 212-23.
14. Jia, L., et al., *Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3878.
15. Jialal, I., H. Kaur, and S. Devaraj, *Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(1): p. 39-48.
16. Kim, F., et al., *Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity*. Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1589-96.
17. Rogero, M.M. and P.C. Calder, *Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids*. Nutrients, 2018. **10**(4).

18. Yin, H., et al., *Gut-derived lipopolysaccharide remodels tumoral microenvironment and synergizes with PD-L1 checkpoint blockade via TLR4/MyD88/AKT/NF-kappaB pathway in pancreatic cancer*. Cell Death Dis, 2021. **12**(11): p. 1033.
19. Farias, A., et al., *A TLR4 agonist improves immune checkpoint blockade treatment by increasing the ratio of effector to regulatory cells within the tumor microenvironment*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 15406.
20. Cen, X., S. Liu, and K. Cheng, *The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and Tumor Immunity*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 878.
21. Vacchelli, E., et al., *Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy*. Oncoimmunology, 2012. **1**(6): p. 894-907.
22. Davis, M.B., et al., *Intratumoral administration of TLR4 agonist absorbed into a cellular vector improves antitumor responses*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(12): p. 3984-92.
23. He, W., et al., *TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance*. Mol Immunol, 2007. **44**(11): p. 2850-9.
24. Li, J., et al., *The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment*. Oncotarget, 2017. **8**(39): p. 66656-66667.
25. Pei, Z., et al., *TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGFbeta1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide*. Cell Immunol, 2008. **254**(1): p. 20-7.
26. Ran, S., *The Role of TLR4 in Chemotherapy-Driven Metastasis*. Cancer Res, 2015. **75**(12): p. 2405-10.
27. Wang, C.H., et al., *Resistin facilitates breast cancer progression via TLR4-mediated induction of mesenchymal phenotypes and stemness properties*. Oncogene, 2018. **37**(5): p. 589-600.
28. Huang, B., et al., *Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5009-14.
29. Apetoh, L., et al., *Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1050-9.
30. Oblak, A. and R. Jerala, *Toll-like receptor 4 activation in cancer progression and therapy*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 609579.
31. Volk-Draper, L., et al., *Paclitaxel therapy promotes breast cancer metastasis in a TLR4-dependent manner*. Cancer Res, 2014. **74**(19): p. 5421-34.
32. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-151.
33. Sims, G.P., et al., *HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 367-88.
34. Holzinger, D., K. Tenbrock, and J. Roth, *Alarmins of the S100-Family in Juvenile Autoimmune and Auto-Inflammatory Diseases*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 182.

35. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
36. Zuniga, M.C., et al., *PKC-epsilon and TLR4 synergistically regulate resistin-mediated inflammation in human macrophages*. Atherosclerosis, 2017. **259**: p. 51-59.
37. Huang, S., et al., *Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways*. J Lipid Res, 2012. **53**(9): p. 2002-13.
38. Hwang, D.H., J.A. Kim, and J.Y. Lee, *Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid*. Eur J Pharmacol, 2016. **785**: p. 24-35.
39. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
40. Cani, P.D., et al., *Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity*. Gut Microbes, 2012. **3**(4): p. 279-88.
41. Zhang, J., et al., *HMGB1, an innate alarmin, plays a critical role in chronic inflammation of adipose tissue in obesity*. Mol Cell Endocrinol, 2017. **454**: p. 103-111.
42. Avgerinos, K.I., et al., *Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives*. Metabolism, 2019. **92**: p. 121-135.
43. Iyengar, N.M., et al., *Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation*. J Clin Oncol, 2016. **34**(35): p. 4270-4276.
44. Khandekar, M.J., P. Cohen, and B.M. Spiegelman, *Molecular mechanisms of cancer development in obesity*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(12): p. 886-95.
45. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): p. 31-46.
46. Wang, Z., et al., *Repairing DNA damage by XRCC6/KU70 reverses TLR4-deficiency-worsened HCC development via restoring senescence and autophagic flux*. Autophagy, 2013. **9**(6): p. 925-7.
47. Seo, S.W., et al., *TLR4-mediated activation of the ERK pathway following UVA irradiation contributes to increased cytokine and MMP expression in senescent human dermal fibroblasts*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0202323.
48. Feng, G., et al., *Repeated stimulation by LPS promotes the senescence of DPSCs via TLR4/MyD88-NF- κ B-p53/p21 signaling*. Cytotechnology, 2018. **70**(3): p. 1023-1035.
49. Davalos, A.R., et al., *p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes*. J Cell Biol, 2013. **201**(4): p. 613-29.
50. Sokolova, M., et al., *Palmitate promotes inflammatory responses and cellular senescence in cardiac fibroblasts*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017. **1862**(2): p. 234-245.
51. Dorr, J.R., et al., *Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 421-5.

52. Chen, X. and J.R. Cubillos-Ruiz, *Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment*. Nat Rev Cancer, 2021. **21**(2): p. 71-88.
53. Ahmad, R., et al., *Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation*. J Inflamm (Lond), 2012. **9**(1): p. 48.
54. Desharnais, L., L.A. Walsh, and D.F. Quail, *Exploiting the obesity-associated immune microenvironment for cancer therapeutics*. Pharmacol Ther, 2022. **229**: p. 107923.
55. Dyck, L., et al., *Suppressive effects of the obese tumor microenvironment on CD8 T cell infiltration and effector function*. J Exp Med, 2022. **219**(3).
56. Lennon, H., et al., *The Obesity Paradox in Cancer: a Review*. Curr Oncol Rep, 2016. **18**(9): p. 56.
57. Wang, Z., et al., *Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade*. Nat Med, 2019. **25**(1): p. 141-151.
58. Hewitt, H.B., E.R. Blake, and A.S. Walder, *A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin*. Br J Cancer, 1976. **33**(3): p. 241-59.
59. Mosely, S.I., et al., *Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 29-41.
60. Bertram, J.S. and P. Janik, *Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture*. Cancer Lett, 1980. **11**(1): p. 63-73.
61. Lechner, M.G., et al., *Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy*. J Immunother, 2013. **36**(9): p. 477-89.
62. Medler, T.R., et al., *Defining Immunogenic and Radioimmunogenic Tumors*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 667075.
63. Hetz, C., et al., *The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1219-43.
64. Martinon, F., et al., *TLR activation of the transcription factor XBPI regulates innate immune responses in macrophages*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 411-8.
65. Martinon, F. and L.H. Glimcher, *Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(1): p. 35-40.
66. Qiu, Q., et al., *Toll-like receptor-mediated IRE1alpha activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis*. EMBO J, 2013. **32**(18): p. 2477-90.
67. Pierre, N., et al., *Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e65061.
68. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
69. Ozcan, U., et al., *Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1137-40.
70. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.

71. Shan, B., et al., *The metabolic ER stress sensor IRE1alpha suppresses alternative activation of macrophages and impairs energy expenditure in obesity*. Nat Immunol, 2017. **18**(5): p. 519-529.
72. Cubillos-Ruiz, J.R., S.E. Bettigole, and L.H. Glimcher, *Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer*. Cell, 2017. **168**(4): p. 692-706.
73. Di Conza, G. and P.C. Ho, *ER Stress Responses: An Emerging Modulator for Innate Immunity*. Cells, 2020. **9**(3).
74. Yan, D., et al., *STAT3 and STAT6 Signaling Pathways Synergize to Promote Cathepsin Secretion from Macrophages via IRE1alpha Activation*. Cell Rep, 2016. **16**(11): p. 2914-2927.
75. Harnoss, J.M., et al., *IRE1alpha Disruption in Triple-Negative Breast Cancer Cooperates with Antiangiogenic Therapy by Reversing ER Stress Adaptation and Remodeling the Tumor Microenvironment*. Cancer Res, 2020. **80**(11): p. 2368-2379.
76. Lancaster, G.I., et al., *Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism*. Cell Metab, 2018. **27**(5): p. 1096-1110.e5.
77. Blazanin, N., et al., *ER stress and distinct outputs of the IRE1alpha RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(37): p. 9900-9905.
78. Zhu, B., et al., *The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) promotes oncogene-induced cellular senescence through repression of endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2014. **289**(29): p. 20102-19.
79. Denoyelle, C., et al., *Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(10): p. 1053-63.
80. Yoshimoto, S., et al., *Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome*. Nature, 2013. **499**(7456): p. 97-101.
81. Neault, M., F.A. Mallette, and S. Richard, *miR-137 Modulates a Tumor Suppressor Network-Inducing Senescence in Pancreatic Cancer Cells*. Cell Rep, 2016. **14**(8): p. 1966-78.
82. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
83. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1798-806.
84. Pozarowski, P. and Z. Darzynkiewicz, *Analysis of cell cycle by flow cytometry*. Methods Mol Biol, 2004. **281**: p. 301-11.
85. Yoon, S.B., et al., *Real-time PCR quantification of spliced X-box binding protein 1 (XBPI) using a universal primer method*. PLoS One, 2019. **14**(7): p. e0219978.

Chapitre 5 – Discussion générale

5.1 Cancer et sénolyse durant l'obésité

Une association épidémiologique entre l'obésité et le cancer souligne l'importance de ce facteur de risque [22, 747]. Malgré une littérature abondante explorant les causes moléculaires de ce lien, les mécanismes par lesquels une tumeur maligne puisse bénéficier de l'obésité restent mal compris. Le rôle de l'inflammation chronique de faible grade est, sans contredit, un des phénomènes les plus importants. De façon intéressante, la sénescence cellulaire accélère le vieillissement, réduit l'efficacité de la réponse immunitaire et augmente l'inflammation chronique dans l'obésité, en plus de participer à la pathogénèse de conditions associées à un surplus de poids [408-411, 414]. Dans notre étude, les patients obèses avec métastases de CRC dans le foie exhibaient des niveaux élevés de cellules p16^{INK4a}-positives et une présence importante de PAI-1 dans les zones tumorales. L'expression de p16^{INK4a} chez l'homme participe à la sénescence cellulaire dans les phases précoces du développement néoplasique, mais peut également être un indicateur de pronostic défavorable dans les stades avancés [748, 749]. Toutefois, il n'est pas clair si l'expression de p16^{INK4a} est liée à la sénescence dans les phases avancées de cancer. Bien que l'accumulation de cellules sénescents s'accompagne d'un SASP, qui sécrété de façon chronique alimente le cancer [377, 428], l'implication des cellules sénescents à la tumorigénèse n'a pas été étudiée de manière approfondie dans le contexte de l'obésité.

Dans notre premier manuscrit, nous avons exploré la possibilité qu'une adiposité élevée puisse être un déclencheur de la sénescence cellulaire et entraîner la croissance tumorale. Il a récemment été rapporté que le fardeau tumoral et les stades avancés de cancers sont liés à une hypo-réactivité immunitaire [407]. De plus, une étude récente démontre que pendant la phase métastatique du cancer gastrique, caractérisée par une mauvaise réponse au traitement, les cellules cancéreuses acquièrent des propriétés de transition épithéliale-mésenchymateuse par le biais de processus de sénescence cellulaire [750]. Ces données suggèrent que la sénescence cellulaire puisse participer à l'établissement d'un environnement immunosuppresseur qui bénéficie au cancer, surtout durant les stades avancés, soit au stade où une expression de p16^{INK4a} a été rapporté par notre groupe et d'autres [748, 749]. Aligné avec ce concept, nous avons observé une corrélation inverse entre la sénescence cellulaire et l'immunogénicité dans différentes lignées cellulaires tumorales.

Les tumeurs LLC et B16-F10, soit des lignées tumorales faiblement ou modérément immunogènes, présentant des caractéristiques de sénescence, alors que ces observations étaient absentes des tumeurs immunogènes MC-38. Il est connu que l'obésité induite par l'alimentation altère l'infiltration et la fonction des lymphocytes T CD8⁺ dans les tumeurs MC-38, ce qui accélère la croissance tumorale chez la souris [279]. Ainsi, bien que la croissance tumorale soit généralement accentuée pendant l'obésité, différents environnements immunitaires tumoraux dictent diverses réponses protumorales. De surcroît, une étude récente montre que l'entrée de ces cellules en état de quiescence procure une résistance de la tumeur face aux lymphocyte T et participe à l'installation d'un MET immunosuppresseur [751]. Ce phénotype est rapporté pour contribuer à la diminution de l'immunogénicité et l'efficacité à l'immunothérapie dans le traitement de cancer du sein triple négatif. Alors que les tumeurs hautement immunogènes dépendent de la fonctionnalité des lymphocytes T, nous montrons que la sénescence cellulaire dans les tumeurs profite aux tumeurs faiblement immunogènes. Dans ce type de tumeurs, il semble que les cellules cancéreuses en arrêt du cycle cellulaire contribuent au maintien d'un environnement immunosuppresseur protumoral. Nous fournissons aussi la preuve de concept qu'une population spécifique de cellules cancéreuses s'engage dans un état de sénescence cellulaire et que celles-ci peuvent être efficacement ciblées au moyen de la sénolyse avec l'inhibiteur ABT-263. Bien qu'une stratégie sénolytique ait montré une efficacité limitée pour le traitement de cancers solides [510] et que l'ABT-263 ait des effets secondaires importants, notamment la neutropénie et la thrombocytopénie [519, 532], notre étude montre que l'obésité est une condition induisant une sénescence cellulaire au sein des tumeurs faiblement immunogènes. Ces effets secondaires apparaissent après un traitement chronique ou à forte dose et peuvent être gérés par la mise en place d'une période de retrait de traitement, la réduction de la dose ou l'administration de GCSF [519, 534, 535]. En somme, notre première étude ouvre la voie pour l'investigation d'alternatives sénolytiques plus sûres et plus ciblées pour le traitement de patients cancéreux présentant une adiposité accrue (**Figure 7**).

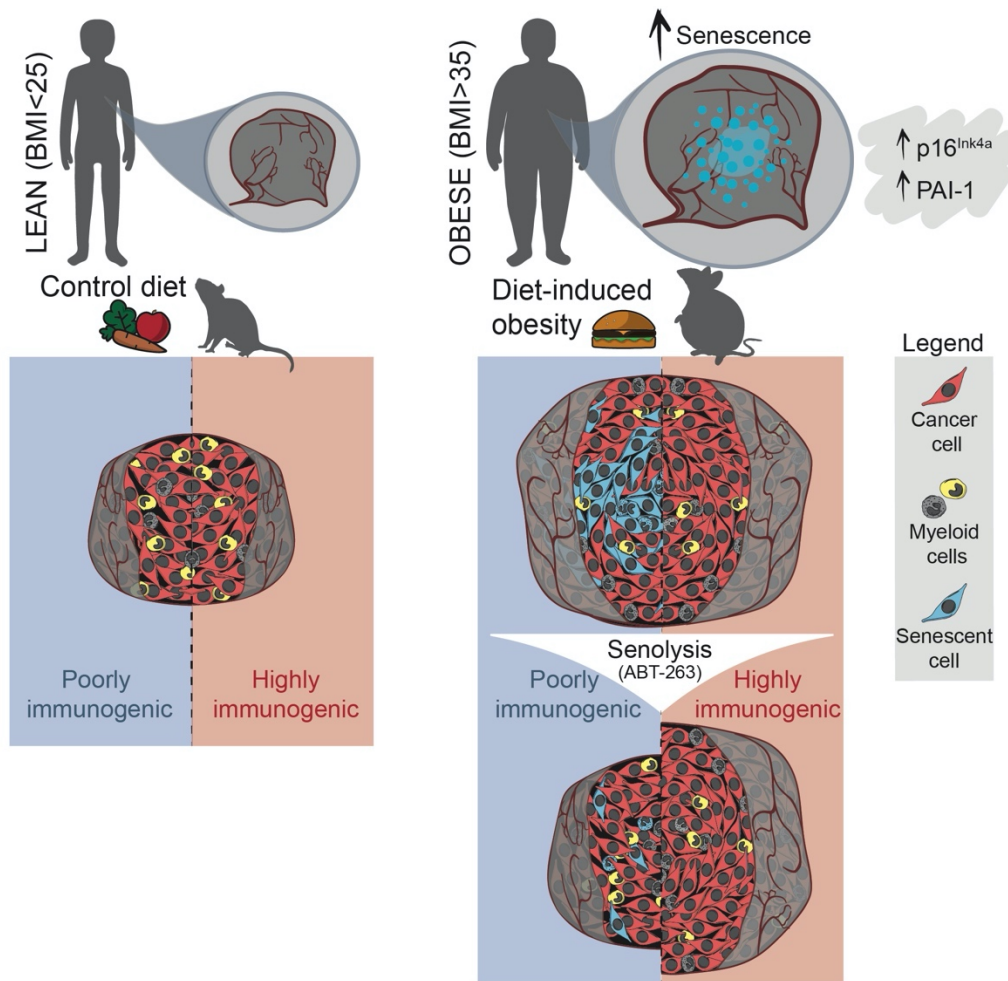


Figure 22. – Résumé graphique du premier article de la thèse (Chapitre 3).

L'obésité augmente la susceptibilité à la sénolyse de cancers faiblement immunogènes

5.2 Signalisation TLR4-IRE1 α dans la sénescence cellulaire du MET

Dans la deuxième étude, nous avons identifié un rôle de TLR4 dans la croissance tumorale en obésité et l'établissement de la sénescence cellulaire dans les tumeurs faiblement immunogènes. De surcroît, nous avons identifié un rôle protumoral important des cellules myéloïdes associées aux tumeurs via le stress du réticulum endoplasmique médié par IRE1 α dans ce contexte. Spécifiquement, nos données montrent que l'expression d'IRE1 α au sein des cellules myéloïde est nécessaire au développement de tumeurs faiblement immunogènes ainsi qu'à l'induction des voies de la sénescence cellulaire.

TLR4 accentue la croissance tumorale de cancer faiblement immunogène dans l'obésité

Une vaste littérature explore le rôle de TLR4 dans la croissance tumorale considérant son impact profond sur l'initiation de l'inflammation et l'établissement d'une réponse immunitaire. Certains groupes montrent qu'il est possible de prendre avantage de l'activation de TLR4 pour améliorer les traitements d'immunothérapie [346, 347, 349, 362]. En contrepartie, de nombreuses études montrent qu'une condition engendrant une activation constitutive de TLR4 déclenche une réponse protumorale via, notamment, le maintien de l'inflammation, la promotion de l'angiogénèse tumorale ainsi que l'évasion et la survie des cellules cancéreuses [173, 596, 752-755]. Cette idée est d'ailleurs supportée par une étude montrant que l'expression de ce récepteur est nécessaire pour soutenir la progression de néoplasme, alors qu'il est dispensable pour l'initiation néoplasique [111]. Ceci dit, le lien entre TLR4 et la sénescence cellulaire est mal connu. Il a été rapporté que TLR4 participe à l'établissement de la sénescence cellulaire suite à une réponse aux dommages à l'ADN [742, 743] ou à une stimulation répétée de LPS [744] en plus d'encourager la sécrétion du SASP via des activateurs trouvés abondamment en obésité comme HMGB1 [737] et le palmitate [756]. Cependant, la façon dont les ligands de TLR4 induisent la sénescence cellulaire *in vivo*, dans le contexte de l'obésité, est largement inconnue. Dans notre étude, nous montrons que TLR4 participe à la sénescence tumorale au cours de l'obésité expérimentale dans un modèle de tumeur faiblement immunogène. Précédemment, la seule étude montrant qu'un cancer induit par l'obésité profite du SASP a aussi montré que l'expression de TLR4 n'était pas nécessaire dans ce phénotype [710]. De façon intéressante, les auteurs utilisent un modèle de carcinome hépatique induit chimiquement présentant un profil tumoral hautement mutagène et immunogène. Ces données supportent notre trouvaille et présente une étape importante dans la recherche sur le cancer en élucidant une voie empruntée par les cancers faiblement immunogènes et la nécessité de TLR4 dans l'établissement de la sénescence tumorale dans ce contexte. En addition, notre étude met en évidence des implications translationnelle de TLR4 dans le cancer en obésité. Nous rapportons une expression exacerbée de TLR4 dans les tumeurs métastatiques de patients ayant un IMC élevé (>35). De façon intéressante, la même cohorte de patients a permis de montrer l'expression élevée de p16^{INK4a} et PAI-1 associée à l'obésité. Ces patients étaient non-répondants aux traitements et se trouvaient aux stades avancés de la maladie. Il serait alors intéressant de vérifier si la signalisation de TLR4 promouvoit un environnement immunosuppresseur où la sénescence cellulaire encourage

le développement de tumeurs puisque que les tumeurs LLC, spécifiquement affectées par TLR4 au cours de l'obésité expérimentale, sont susceptibles à la sénolyse.

Un stress du réticulum endoplasmique médié par IRE1a dans les cellules myéloïdes participe à la croissance et la sénescence tumorale via TLR4

Des données transcriptomiques nous ont aussi permis de révéler une forte association entre l'obésité induite par la diète et une réponse aux protéines mal repliées ou *unfolded protein response* (UPR) au sein des cellules myéloïdes associées aux tumeurs. Voici une brève présentation de cette réponse. L'abondance et le flux important de polypeptides nouvellement synthétisés dans le réticulum endoplasmique peut engendrer une surcharge de la machinerie de repliement protéique et l'accumulation de protéines mal repliées, un phénomène connu sous le nom de stress du réticulum endoplasmique ou *ER stress* [757]. Plus une cellule est sécrétoire, (ex. cellule immunitaire, cellules bêta pancréatiques ou une cellule maligne), plus la demande sur le système de repliement des protéines est élevée [758-761]. De façon intéressante, tout comme pour l'induction de la sénescence cellulaire, plusieurs conditions environnementales, en plus de l'incapacité à replier les protéines, peuvent engendrer un stress du réticulum endoplasmique telles la privation de nutriments [762], un stress oxydatif [763], l'inefficacité de l'autophagie [764] ou l'hypoxie [765]. En vue de restaurer la capacité de la cellules à replier efficacement ses polypeptides, un réseau de transcription et de traduction coordonné, soit l'UPR est initié [766]. L'UPR consiste en 3 branches distinctes, soit l'*inositol requiring enzyme 1 a* (IRE1a), *double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase* (PERK) et *activating transcription factor 6* (ATF6) [767]. La branche de l'UPR régulée par IRE1a possède un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine endoribonucléase sur son extrémité cytosolique [768]. Ce dernier engendre le clivage de XBP1 et mène à la production d'une forme épissée (XBP1s) qui agit comme activateur de transcription de gènes impliqués dans le repliement et la dégradation protéique [668, 769-771]. Ce phénomène participe au développement de cellules hautement sécrétoires, ainsi qu'à l'adaptation des cellules tumorales aux conditions hypoxiques et à la privation de glucose [771, 772]. Dans les macrophages, IRE1a peut aussi engendrer une production de cytokines pro-inflammatoires via l'activité transcriptionnelle de XBP1s et GSK3β [773].

Considérant les effets de réponse au stress environnementaux et de promotion de l'inflammation de IRE1a et de XBP1, il n'est pas surprenant de voir qu'ils jouent un rôle important sur la

tumorigénèse. En addition à nos données sur l'impact de l'activation myéloïde-spécifique de IRE1 α sur la croissance tumorale en obésité, il a été précédemment été rapporté que IRE1 α , et son effecteur XBP1s [774], sont importants dans la tumorigénèse, l'agressivité et la résistance aux traitements de plusieurs cancers tels la leucémie [775], le myélome [759, 760], le glioblastome [776], le cancer de la prostate [774, 777], le cancer colorectal [778] et le cancer du sein [779, 780]. Par exemple, la signalisation IRE1 α /XBP1s contribue au développement du cancer de la prostate et le cancer du sein en mettant une pression positive sur l'expression de l'oncogène c-MYC [779, 781]. Ceci dit, plusieurs groupes ont montré que TLR4, tout comme TLR2, active la voie inflammatoire de IRE1 α /XBP1s dans les macrophages, et ce, même en l'absence de réponse spécifique du *ER stress* [782-784]. Par exemple, il a été proposé que, dans l'arthrite inflammatoire, la signalisation TLR4/IRE1 α soit une importante voie de traitement [785]. Dans l'obésité, il a été démontré que la délétion de TLR4 protège les souris contre un *ER stress* suite à une diète riche en gras dans le foie, les muscles et le tissu adipeux [786]. Il a aussi été rapporté que la voie TLR4/IRE1 α contribue à la lipotoxicité induite par le palmitate dans les hépatocytes [787]. De plus, plusieurs études appuient la notion selon laquelle l'activation des TLRs et l'induction du *ER stress* sont des mécanismes conjoints liant l'obésité à la résistance à l'insuline et au diabète de type 2 [658, 788, 789]. Il a par ailleurs été montré que XBP1s, dans les cellules myéloïdes, est important pour une réponse immunitaire efficace en induisant la production et la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B en réponse à un traitement au LPS [771, 790]. Aussi, un groupe a montré que l'activation soutenue de la voie IRE1 α /XBP1s, causée par une peroxydation lipidique importante des cellules tumorales, déclenche une accumulation anormale de lipides, inhibe la présentation d'antigène par les cellules myéloïdes, et, conséquemment, l'activation des lymphocytes T [791]. De plus, les cytokine anti-inflammatoires comme IL-4, IL-6 et IL-10, présents dans un MET immunosuppresseur, active IRE1 α dans les cellules myéloïdes [792], ce qui peut induire l'expression de PGE2 pour maintenir l'immunotolérance et promouvoir la progression tumorale [793]. De façon intéressante, une étude récente montre aussi qu'une diète riche en gras entraîne une tumorigénèse liée au vieillissement et à l'obésité via l'activation de voies immunosuppressives et les effecteurs de l'UPR [794]. Ainsi, il apparaît que IRE1 α soit impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire tumorale dans un processus qui fait intervenir le métabolisme des lipides. En effet, il semble que l'expression hépatique de IRE1 α puisse aussi remodeler le métabolisme pour encourager la β -oxydation et la cétogénèse durant une privation de nutriments [795]. De plus, un

groupe a publié une étude pionnière montrant que l'inflammation TLR4-dépendante dans les macrophages dépend d'une reprogrammation métabolique impliquant la signalisation IRE1 α /XBP1s [667]. De surcroît, une étude prenant avantage d'un modèle de délétion spécifique de IRE1 α dans les cellules myéloïdes montre l'impact de cette voie sur l'état métabolique et immunologique d'un microenvironnement adipeux en obésité [796]. Les auteurs montrent que la délétion spécifique aux cellules myéloïdes de IRE1 α diminue le nombre de macrophages pro-inflammatoires et diminue la prise de poids, la résistance à l'insuline, l'hyperlipidémie et la stéatose hépatique induites par l'obésité expérimentale. Ainsi, la voie de signalisation de IRE1 α , au sein des cellules myéloïdes, semble particulièrement importante autant dans l'établissement d'un MET immunosuppresseur que dans la promotion de conditions pathologiques associées à l'obésité. En utilisant le même modèle de délétion spécifique de IRE1 α dans les cellules myéloïdes que mentionné précédemment, nous montrons que cette signalisation façonne le microenvironnement de tumeurs pour permettre la croissance tumorale de souris sur diète riche en gras via TLR4. Une étude subséquente permettrait d'investiguer l'effet de cette délétion sur le métabolisme des cellules myéloïdes associées aux tumeurs LLC. Nos données transcriptomiques suggèrent tout de même une prévalence de la glycolyse chez ces cellules, un métabolisme fortement emprunté par les cellules sénescentes [797, 798].

D'autre part, différentes études ont montrées que la voie IRE1 α /XBP1s peut être associée à l'induction de la sénescence cellulaire. Le stress oncogénique de HRAS peut notamment induire une sénescence qui serait régulée par IRE1 α [799] et XBP1 [800], tout comme la sénescence induite par la doxorubicine, un agent chimio-thérapeutique, dans les cellules de lymphomes [551]. Sans toutefois investiguer l'induction de la sénescence cellulaire, un groupe a récemment montré qu'un stress génotoxique induit l'activation du RIDD (Regulated IRE1-dependent decay) pour assurer la réponse au dommage à l'ADN [801]. Il a aussi été montré que XBP1, tout comme ATF6 α et ATF4, est important pour l'activité de l'enzyme β -galactosidase associé à la sénescence dans les mélanocytes avec la mutation oncogénique HRasGV12 [802]. Dans le laboratoire, nous avons également montré que IRE1 α participe à l'établissement de la sénescence cellulaire et la sécrétion du SASP dans un modèle de rétinopathie proliférative [441]. D'ailleurs, il est accepté que le stress protéotoxique du SASP induise une réponse UPR [551]. Ces évidences appuient nos données selon lesquelles une signalisation TLR4/IRE1 α profite aux tumeurs faiblement immunogéniques via l'établissement d'un environnement immunosuppresseur. Avec cette étude, nous montrons, pour la

première fois, qu'un régime riche en gras induit une réponse de stress du réticulum endoplasmique médiée par IRE1 α , dans les cellules myéloïdes, favorisant la sénescence cellulaire via TLR4 (Figure 7).

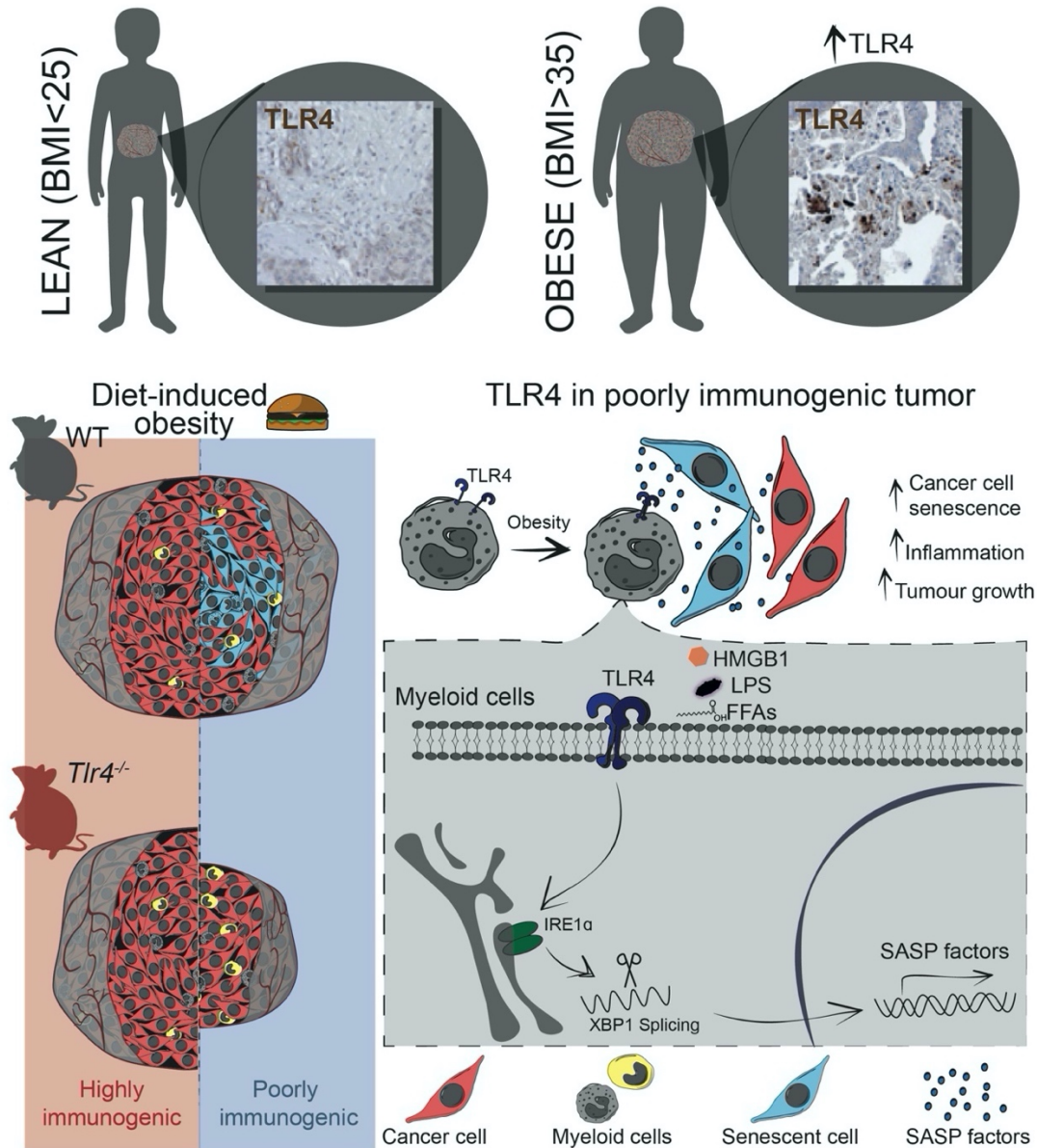


Figure 23. – Résumé graphique du deuxième article de la thèse (Chapitre 3).

Rôle de la signalisation TLR4/IRE1 α dans les cellules myéloïdes du MET en obésité dans un contexte de tumeurs faiblement immunogènes sur la sénescence des cellules cancéreuses et la croissance tumorale.

5.3 Perspectives et limites de l'étude

Études humaines de thérapie sénolytique

Le développement du cancer se fait en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. L'étape d'initiation représente l'étape au cours de laquelle les dommages à l'ADN surviennent au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs, soit les gènes apoptotiques et impliqués dans la bonne régulation du cycle cellulaire (ex. *Cdkn2a*, *Rb*, *Tp53*, etc.) et des oncogènes, soit les gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire (ex. *Ras*, *Myc*, *Raf*, etc.) [803]. L'étape de promotion s'avère être l'expansion clonale des cellules initiées et déficientes en processus de mort cellulaire programmée. Pour finir, l'étape de progression représente l'étape d'établissement du microenvironnement tumoral et de métastases [803]. L'utilisation d'un modèle d'inoculation syngénique pose une limite sur l'étude de l'étape d'initiation tumorale. Cependant, ce modèle permet d'inoculer des cellules tumorales sans compromettre le système immunitaire de l'animal. Par conséquent, il est possible d'investiguer les dynamiques immunitaires en fonction des conditions à l'étude. Dans notre étude, nous souhaitons investiguer l'impact de la sénescence à des stades plus avancés de la maladie, là où elle joue un rôle plutôt protumoral qu'antitumoral. Ainsi, l'inoculation syngénique de cellules cancéreuses nous a permis d'investiguer la dernière phase du développement de tumeurs durant l'obésité expérimentale. En effet, en plus de nos données montrant une corrélation entre les marqueurs de sénescence cellulaire p16^{INK4a} et PAI-1 et un IMC > 35 dans des coupes histologiques de patients avec métastases de CRC, d'autres groupes ont aussi montré une expression élevée de p16^{INK4a} dans des biopsies de patients souffrant de stades avancés de cancers [748, 749, 804]. Dans ce contexte, il est suggéré que la sénescence ne soit pas impliquée puisque les zones tumorales sont abondantes en cellules prolifératives. Néanmoins, il n'est pas clair si la sénescence cellulaire ne pourrait pas contribuer à l'établissement d'un MET comme on le retrouve dans ces stades avancés et participer à la prolifération accrue qui est observée par ces groupes. Une étude humaine explorant l'effet de traitements sénolytiques chez les patients avec une adiposité accrue serait une avenue intéressante pour investiguer la susceptibilité de cancers induits par l'obésité pour la sénolyse. La recherche sur l'utilisation des *BH3-mimetics* dans le traitement du cancer est en plein essor. Dans les cancers où l'expression de BCL-xL est importante pour le développement, comme dans le cas de cancer colorectaux [805, 806], l'inhibition de cette protéine anti-apoptotique peut être combiné avec la chimiothérapie ou la

radiothérapie pour diminuer la résistance au traitement [807, 808]. Toutefois, il semble que l'ABT-263, en monothérapie, n'a que de faibles effets thérapeutiques sur cette condition. De façon intéressante, dans plusieurs études, il est néanmoins démontré que l'efficacité d'un inhibiteur de BCL-xL peut être synergisé à l'inhibition combinatoire des voies oncogènes initiatrices [809-811]. Ainsi, la dépendance de certains cancers pour la famille BCL-2 peut potentiellement être exploitée en thérapie combinatoire. Des essais cliniques sont d'ailleurs en cours pour tester l'efficacité de ces thérapies chez l'homme (NCT03222609, NCT02079740, NCT01989585). Une étude récente montre aussi l'efficacité d'une thérapie combinant deux *BH3-mimetics*, soit le Navitoclax et le BTSA1.2, une petite molécule activatrice de BAX, alors que les monothérapies ne montraient que de faibles efficacités [812]. L'efficacité du ciblage des protéines de la famille BCL-2, bien que montrant des résultats décevants en monothérapie, reste une avenue hautement envisageable en thérapie combinatoire. Notre étude montre bien que des modèles d'inflammation chronique, comme l'obésité induite par la diète, peuvent amplifier l'expression de protéines de la famille BCL-2 et accentuer la sensibilité des tumeurs à un inhibiteur de BCL-xL comme le Navitoclax.

Impact de l'immunogénicité sur la croissance tumorale induite par l'obésité

La caractérisation de l'immunogénicité du cancer est basée sur des facteurs contingents majoritairement associés à la capacité du système immunitaire à enclencher une réponse antitumorale. Typiquement, un ratio de cellule myéloïde/lymphocyte positif favorise la croissance tumorale [324-327], mais l'établissement du MET reste une chaîne dynamique d'événements difficiles à évaluer, en particulier dans des circonstances variables telles que le degré d'obésité et l'adiposité corporelle. Il a d'ailleurs récemment été mis en évidence que les TAMs sont hautement hétérogènes dans le MET. Un groupe vient tout juste de montrer qu'en divisant les TAMs en fonction de leur métabolisme le plus prédominant, on peut identifier des sous-populations de macrophages qui jouent des rôles spécifiques et relatifs sur le MET [813]. Malgré la notion générale selon laquelle une forte infiltration de macrophages soit associée à un mauvais pronostic en participant à la progression tumorale [814-818], des groupes ont aussi montré que les TAMs peuvent conférer un avantage en initiant la phagocytose tumorale, la présentation d'antigènes tumoraux aux lymphocytes T et en favorisant l'immunité antitumorale [819-821]. En somme, notre étude compte des limitations dans l'établissement d'un seuil d'immunogénicité à des fins translationnelles, bien que les lignées cancéreuses utilisées aient été préalablement caractérisées

[311, 313-316]. Ceci dit, les différences significatives appréciées dans les souris inoculées avec les LLC, en comparaison des souris inoculées avec les autres lignées cancéreuses testées soulignent l'importance du système immunitaire inné pour l'établissement d'un MET favorable dans un modèle expérimental d'obésité.

Étude complémentaire d'activation chronique de TLR4 dans un modèle infectieux

En plus des données générales témoignant de l'impact du métabolisme sur l'hétérogénéité intracellulaire dans le MET, il a été rapporté que la stimulation des récepteurs TLRs déplace le métabolisme vers la glycolyse tandis que des stimulations anti-inflammatoires influencent le métabolisme vers la respiration mitochondriale [822]. Les auteurs de cet article montrent aussi, dans un modèle de psoriasis, que la forte teneur en FFAs influence le métabolisme des cellules myéloïdes via une signalisation TLR4/IRE1 α maintenue active par un stress oxydatif pour soutenir l'inflammation chronique. Ainsi, les réponses inflammatoires dirigées par TLR4 sont étroitement associées au métabolisme énergétique et à IRE1 α . Un autre groupe a montré que lors d'infections bactériennes, une compétition pour l'énergie entre des programmes de maintien de la température corporelle et de l'immunité favorise la tolérance aux infections [823]. Une étude subséquente viserait à étudier l'impact de la signalisation TLR4/IRE1 α , rapportée dans notre étude, sur le métabolisme énergétique des cellules myéloïdes dans le MET. De surcroît, il serait intéressant d'utiliser un modèle d'immunité entraînée et de tolérance immunitaire, via un ligand pathogénique comme le LPS, pour mieux comprendre comment le métabolisme des cellules myéloïdes contrôle ses dynamiques immunitaires et, incidemment, la progression tumorale. À cet effet, des données préliminaires du laboratoire montrent qu'une injection simple de LPS (immunité entraînée) un mois avant l'inoculation de LLC diminue significativement la croissance tumorale, alors que des injections répétées de LPS (tolérance immunitaire) accentuent cette croissance [Fournier, Hata *et al*, en cours]. De surcroît, au même titre qu'une diète riche en gras, l'injection multiple de LPS augmente l'activité SA- β -gal dans les cellules cancéreuses et promouvoit l'expression de signatures de sénescence cellulaire et de stress du réticulum endoplasmique médié par IRE1 α . D'autres évidences sont toutefois nécessaires pour investiguer l'impact du métabolisme immunitaire sur ce phénomène.

Identification et caractérisation des cellules immunitaires sénescents

L'activité de la β -galactosidase associée aux cellules sénescents, ou SA- β -gal, est un marqueur largement utilisé pour identifier une cellule en sénescence dans un tissu ou un pétri [378]. Nombreuses sont les publications qui, en utilisant la SA- β -gal, étiquettent une population de cellules d'intérêts comme étant des cellules en sénescence [380, 383, 390, 416]. Ceci dit, une cellule qui possède une forte activité lysosomale, comme une cellule immunitaire par exemple, peut engendrer un résultat positif lors de l'évaluation de la SA- β -gal [382-384]. Pour cette raison, le concept d'immunosénescence reste un sujet controversé et mal compris. Dans notre étude, nous avons adapté un protocole de détection de la SA- β -gal en *in vivo* avec une résolution cellulaire en utilisant la cytométrie en flux [746]. En utilisant le 5-Dodecanoylaminofluorescein Di- β -D-Galactopyranoside (C₁₂FDG), soit un substrat de la β -galactosidase qui, une fois clivé par l'enzyme génère un produit fluorescent détectable dans le vert, il nous est possible d'identifier des cellules avec une forte activité de la β -galactosidase. Cette technique nous a permis d'évaluer l'effet de la sénolyse, ainsi que de la délétion de nos protéines d'intérêts (TLR4 ou IRE1 α) sur la SA- β -gal. Pour confirmer la présence d'une population de cellule sénescents, nous avons systématiquement évalué plusieurs autres marqueurs pour éviter une mauvaise identification. Malgré une signature transcriptionnelle suggérant une entrée en sénescence cellulaire des cellules myéloïdes, une forte activité β -galactosidase des TAMs et des TANs ainsi qu'une forte transcription de plusieurs facteurs associé au SASP, nous avons été incapables de montrer que les cellules myéloïdes entrent dans un état de sénescence cellulaire suite à une diète riche en gras. Alors que la sénolyse n'a aucun effet sur l'abondance des TAMs et des TANs, la délétion de TLR4 n'affecte pas l'expression des régulateurs du cycle cellulaire ou de protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 et n'a aucun effet sur l'arrêt de leur cycle cellulaire. Néanmoins, durant l'obésité, il semble que l'activité des cellules myéloïdes participe à la sénescence des cellules cancéreuses et accentue la croissance tumorale. Sans pour autant être sénescents, les cellules myéloïdes associées aux tumeurs partagent des caractéristiques avec les cellules sénescents pour engendrer cet effet. L'immunosénescence au sens de l'épuisement de la réponse immunitaire et de l'établissement d'un environnement immunosuppresseur est un concept important pour comprendre comment une tumeur maligne échappe au système immunitaire pour se développer. Néanmoins, nos données sont un bon exemple de la complexité de l'identification de cellules immunitaires sénescents. Des études seront nécessaires pour investiguer l'immunosénescence et approfondir sa caractérisation.

Expression de TLR4 dans les cellules myéloïdes

Malgré la mise en évidence du rôle central de TLR4 dans la lignée myéloïde, une limite importante de notre étude est que notre modèle de délétion de TLR4 *in vivo* n'était pas spécifique aux cellules myéloïdes. Néanmoins, nous avons pu démontrer que la signalisation TLR4/IRE1 α dans les cellules myéloïdes prescrivait la sénescence tumorale et assurait le développement tumoral au moyen d'un modèle de délétion de IRE1 α spécifique aux cellules myéloïdes. De plus, la délétion systémique de TLR4 s'accompagne d'une inhibition de la phosphorylation de IRE1 α et de l'épissage de XBP1 au sein des TAMs de souris nourries avec une diète riche en gras.

Identification d'activateurs de TLR4 dans l'établissement d'un MET immunosuppresseur et pro-sénescence

De façon intéressante, des effets similaires à la sénolyse sont obtenus par un régime calorique réduit [824, 825]. En appui à cette idée que le surplus de poids causé par la diète soit préjudiciable sur le vieillissement cellulaire, il semble que les composants du régime méditerranéen (niveaux élevés de fibres et d'antioxydants) préviennent les dommages cellulaires [826]. Ces données soulignent non seulement l'idée que l'obésité accélère le vieillissement, mais que la diète contribue directement à ce phénomène. Comme susmentionné, une myriade d'activateurs de la signalisation de TLR4 sont augmentés chez un hôte obèse, en comparaison avec un hôte non-obèse, comme le LPS et le palmitate par exemple. De façon complémentaire, le stress du réticulum endoplasmique peut être déclenché par les virus et les bactéries [827, 828] ainsi que des facteurs métaboliques et nutritionnels tels que des taux élevés de glucose et de lipides [788, 829, 830]. Malgré l'impact des régimes riches en graisses sur le microbiote intestinal, la perméabilité intestinale et l'endotoxémie, le rôle du LPS dans l'induction d'un SASP protumoral en période d'obésité reste pourtant incertain [710]. Bien que plusieurs activateurs de TLR4, incluant le LPS, puissent induire une ou plusieurs caractéristiques de sénescence cellulaire *in vitro*, des données sont manquantes pour comprendre comment l'activation de TLR4 puisse engendrer une réponse immunosuppressive pour laquelle la sénescence cellulaire semble jouer un rôle important. Une étude examinant comment certains de ces ligands et activateurs de la signalisation TLR4/IRE1 α puissent engendrer une sénescence protumorale permettrait de s'approcher encore plus près d'une compréhension moléculaire du lien entre l'obésité et le cancer (**Figure 8**). En outre, il est maintenant accepté qu'une communication intercellulaire durant la sénescence cellulaire, non

seulement via les facteurs solubles du SASP, mais aussi via des exosomes et des vésicules extracellulaires contenant des protéines, des lipides et des microARNs, participent à l'établissement d'un microenvironnement pro-sénescence [831-835]. L'importance de la communication entre les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires activées par TLR4 dans ce contexte reste toujours inexploré.

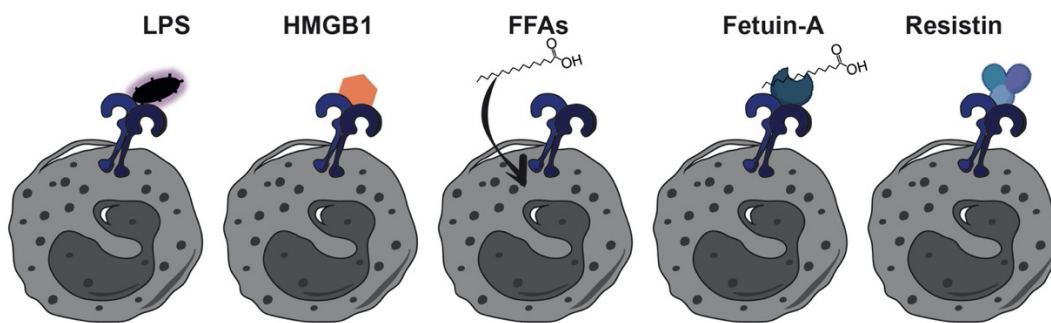


Figure 24. – Représentation schématique des ligands et activateurs de TLR4 augmentés systématiquement en obésité.

Chapitre 6 – Conclusion

Pour conclure, le cancer est la première cause de décès au pays [11] et l'obésité est un facteur de risque majeur de cette maladie [12]. Parmi les caractéristiques acquises d'un environnement d'obésité participant au développement de cancers, l'inflammation chronique de bas grade ressort comme un élément pivot. Durant l'obésité, l'induction de la sénescence cellulaire est liée à l'accélération du vieillissement immunitaire [391] et l'accumulation de cellules sénescents dans différents tissus participe à l'établissement de conditions inflammatoires secondaires à l'obésité ainsi qu'à la prise de poids elle-même [408-411]. Comme la littérature montre qu'un SASP, accompagnant l'accumulation de cellules sénescents, puisse bénéficier à une tumeur en développement, nous avons investigué la présence de cellules sénescents et leur impact sur le développement tumoral dans un modèle expérimental d'obésité. En utilisant un paradigme expérimental qui jumèle un modèle de DIO, un modèle de cancer par inoculation syngénique et un modèle de sénolyse par administration de l'ABT-263, nous rapportons qu'une diète riche en gras induit la sénescence tumorale spécifiquement au sein de tumeurs faiblement immunogènes qui deviennent susceptibles à la sénolyse. Notre étude suggère alors que l'obésité soit un inducteur de

sénescence participant à la progression tumorale et que la sénolyse puisse être prise en considération pour traiter les patients cancéreux en obésité.

Ceci dit, l'utilisation d'inhibiteurs des protéines BCL-2, comme ABT-263, comme stratégie sénolytique présentent des effets secondaires dont la neutropénie et la thrombocytopénie lorsqu'utilisée de façon chronique et à forte dose [519, 532]. De plus, dans le traitement du cancer, ce genre de stratégies n'a, jusqu'à maintenant, montré que des résultats modérés. Nous visions donc à investiguer une voie moléculaire responsable de l'installation de la sénescence cellulaire dans les tumeurs faiblement immunogènes pour accroître nos connaissances du lien entre le cancer et l'obésité. Ultimement, ces avancées pourraient participer à l'élaboration de stratégies thérapeutiques plus spécifiques. En utilisant un paradigme expérimental qui jumèle un modèle de DIO et un modèle de cancer par inoculation syngénique, nous rapportons que TLR4 est important pour la promotion de la croissance tumorale induite par l'obésité, et ce, spécifiquement dans des tumeurs faiblement immunogènes LLC. Ce présent travail met également en évidence des implications translationnelles de TLR4 dans le cancer au cours de l'obésité. De surcroît, des données transcriptomiques ont permis de révéler un rôle inattendu du stress du réticulum endoplasmique, et spécifiquement de l'effecteur IRE1 α dans les cellules myéloïdes pour la signalisation de TLR4 menant à l'établissement de la sénescence et de la croissance tumorale. Notre étude suggère ainsi qu'une signalisation TLR4/IRE1 α , dans les cellules myéloïdes associées aux tumeurs LLC, joue un rôle important pour la promotion de la croissance tumorale en obésité via l'induction d'une sénescence protumorale. Ce travail établit les fondements d'une compréhension moléculaire du lien entre les régimes à forte teneur calorique et l'immunité protumorale. Il montre que la sénescence cellulaire joue un rôle majeur dans le développement de cancers faiblement immuno-réactifs, un phénomène qu'il nous faut toutefois cibler avec des stratégies thérapeutiques plus spécifiques et qui prennent en compte le rôle ambivalent de TLR4 dans la réactivité immunitaire.

Références bibliographiques

1. Dictionary, O.E. *Cancer*. 2022 [cited 2022 2022-02-16]; Available from: <https://www.oed.com/view/Entry/26933?rskey=NnALXN&result=1#>.
2. Bordet, I.J. *Historique : Origine du cancer (Introduction)*. Histoire 2005 [cited 2022 2022-02-14]; Available from: <https://www.bordet.be/fr/presentation/historic/cancer/cancer2.htm>.
3. Nordling, C.O., *A New Theory on the Cancer-inducing Mechanism*. Br J Cancer, 1953. 7(1): p. 68-72.
4. Armitage, P. and R. Doll, *The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis*. Br J Cancer, 1954. 8(1): p. 1-12.
5. Armitage, P. and R. Doll, *A two-stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer*. Br J Cancer, 1957. 11(2): p. 161-9.
6. Knudson, A.G., *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971. 68(4): p. 820-823.
7. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. 12(1): p. 31-46.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
10. Di Micco, R., et al., *Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. 22(2): p. 75-95.
11. Society, C.C. *Cancer statistics at a glance*. 2022 [cited 2022 2022-02-25]; Available from: https://cancer.ca/en/research/cancer-statistics/cancer-statistics-at-a-glance?gclid=Cj0KCQiA0eOPBhCGARIsAFIwTs771NKApzJf2GLQ5VUyncN82nmNDmWRydyFWZCTSKerlZM94T2f6caArxfEALw_wcB.

12. cancer, S.c.d. *Qu'est-ce qui cause le cancer?* 2022 [cited 2022 2022-03-01]; Available from: <https://cancer.ca/fr/cancer-information/what-is-cancer/what-causes-cancer>.
13. Meldrum, D.R., M.A. Morris, and J.C. Gambone, *Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will?* *Fertil Steril*, 2017. **107**(4): p. 833-839.
14. Engin, A., *The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome*. *Adv Exp Med Biol*, 2017. **960**: p. 1-17.
15. Scherer, P.E. and J.A. Hill, *Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Diseases: A Compendium*. *Circ Res*, 2016. **118**(11): p. 1703-5.
16. Key, T.J., et al., *Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(16): p. 1218-26.
17. Li, D., et al., *Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer*. *JAMA*, 2009. **301**(24): p. 2553-62.
18. Lichtman, M.A., *Obesity and the risk for a hematological malignancy: leukemia, lymphoma, or myeloma*. *Oncologist*, 2010. **15**(10): p. 1083-101.
19. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. *Lancet*, 2008. **371**(9612): p. 569-78.
20. Guh, D.P., et al., *The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis*. *BMC Public Health*, 2009. **9**: p. 88.
21. Avgerinos, K.I., et al., *Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives*. *Metabolism*, 2019. **92**: p. 121-135.
22. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
23. Petrelli, F., et al., *Association of Obesity With Survival Outcomes in Patients With Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis*. *JAMA Netw Open*, 2021. **4**(3): p. e213520.
24. (NIH), N.c.i. *Cancer causes and prevention*. 2022 [cited 2022 2022-02-15]; Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/tobacco>.

25. Shachar, S.S. and G.R. Williams, *The Obesity Paradox in Cancer-Moving beyond BMI-Response*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017. **26**(6): p. 981.
26. Lennon, H., et al., *The Obesity Paradox in Cancer: a Review*. *Curr Oncol Rep*, 2016. **18**(9): p. 56.
27. Wang, Z., et al., *Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade*. *Nat Med*, 2019. **25**(1): p. 141-151.
28. Rogers, C.J., K.S. Prabhu, and M. Vijay-Kumar, *The microbiome and obesity-an established risk for certain types of cancer*. *Cancer J*, 2014. **20**(3): p. 176-80.
29. Arterburn, D.E. and A.P. Courcoulas, *Bariatric surgery for obesity and metabolic conditions in adults*. *BMJ*, 2014. **349**: p. g3961.
30. Schauer, P.R., et al., *Outcomes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity*. *Ann Surg*, 2000. **232**(4): p. 515-29.
31. Wickremesekera, K., et al., *Loss of insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a time course study*. *Obes Surg*, 2005. **15**(4): p. 474-81.
32. Adams, T.D., et al., *Cancer incidence and mortality after gastric bypass surgery*. *Obesity (Silver Spring)*, 2009. **17**(4): p. 796-802.
33. Sjostrom, L., et al., *Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(7): p. 653-62.
34. Clement, K., et al., *Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects*. *FASEB J*, 2004. **18**(14): p. 1657-69.
35. Fabian, C.J., et al., *Favorable modulation of benign breast tissue and serum risk biomarkers is associated with > 10 % weight loss in postmenopausal women*. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **142**(1): p. 119-32.
36. Rapp, K., et al., *Weight change and cancer risk in a cohort of more than 65,000 adults in Austria*. *Ann Oncol*, 2008. **19**(4): p. 641-8.

37. Pomatto-Watson, L.C.D., et al., *Daily caloric restriction limits tumor growth more effectively than caloric cycling regardless of dietary composition*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 6201.
38. Lakhdar, N., et al., *Diet and diet combined with chronic aerobic exercise decreases body fat mass and alters plasma and adipose tissue inflammatory markers in obese women*. Inflammation, 2013. **36**(6): p. 1239-47.
39. Kong, L.C., et al., *Insulin resistance and inflammation predict kinetic body weight changes in response to dietary weight loss and maintenance in overweight and obese subjects by using a Bayesian network approach*. Am J Clin Nutr, 2013. **98**(6): p. 1385-94.
40. Khandekar, M.J., P. Cohen, and B.M. Spiegelman, *Molecular mechanisms of cancer development in obesity*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(12): p. 886-95.
41. Elsner, M., W. Gehrman, and S. Lenzen, *Peroxisome-generated hydrogen peroxide as important mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells*. Diabetes, 2011. **60**(1): p. 200-8.
42. Robertson, R.P., et al., *Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S119-24.
43. Kew, M.C., *Obesity as a cause of hepatocellular carcinoma*. Ann Hepatol, 2015. **14**(3): p. 299-303.
44. Rosmorduc, O. and L. Fartoux, *HCC and NASH: how strong is the clinical demonstration?* Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012. **36**(3): p. 202-8.
45. White, D.L., F. Kanwal, and H.B. El-Serag, *Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012. **10**(12): p. 1342-1359 e2.
46. Kitahara, C.M., et al., *Total cholesterol and cancer risk in a large prospective study in Korea*. J Clin Oncol, 2011. **29**(12): p. 1592-8.
47. Nelson, E.R., et al., *27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology*. Science, 2013. **342**(6162): p. 1094-8.

48. Rodrigues Dos Santos, C., et al., *Plasma level of LDL-cholesterol at diagnosis is a predictor factor of breast tumor progression*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 132.
49. Musso, G., R. Gambino, and M. Cassader, *Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Prog Lipid Res, 2013. **52**(1): p. 175-91.
50. Nguyen, P.L., et al., *Fatty acid synthase polymorphisms, tumor expression, body mass index, prostate cancer risk, and survival*. J Clin Oncol, 2010. **28**(25): p. 3958-64.
51. Dirat, B., et al., *Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion*. Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2455-65.
52. Nieman, K.M., et al., *Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(10): p. 1533-41.
53. Tang, W., et al., *White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature*. Science, 2008. **322**(5901): p. 583-6.
54. Sun, K., C.M. Kusminski, and P.E. Scherer, *Adipose tissue remodeling and obesity*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2094-101.
55. Warburg, O., *The metabolism of carcinoma cells*. The Journal of Cancer Research, 1925. **9**(1): p. 148-163.
56. Warburg O, P.K., Negelein E. , *Ueber den stoffwechsel der tumoren*. Biochemische Zeitschrift. , 1924. **152**(1): p. 319–344.
57. Park, J., et al., *Neuregulin 1-HER axis as a key mediator of hyperglycemic memory effects in breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(51): p. 21058-63.
58. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
59. Ryu, T.Y., J. Park, and P.E. Scherer, *Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression*. Diabetes Metab J, 2014. **38**(5): p. 330-6.
60. Jee, S.H., et al., *Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women*. JAMA, 2005. **293**(2): p. 194-202.

61. Rao Kondapally Seshasai, S., et al., *Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death*. N Engl J Med, 2011. **364**(9): p. 829-841.
62. Michels, K.B., et al., *Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study*. Diabetes Care, 2003. **26**(6): p. 1752-8.
63. Ma, J., et al., *A prospective study of plasma C-peptide and colorectal cancer risk in men*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(7): p. 546-53.
64. Vigneri, P., et al., *Diabetes and cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(4): p. 1103-23.
65. Barone, B.B., et al., *Long-term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis*. Jama, 2008. **300**(23): p. 2754-64.
66. Ma, J., et al., *Prediagnostic body-mass index, plasma C-peptide concentration, and prostate cancer-specific mortality in men with prostate cancer: a long-term survival analysis*. Lancet Oncol, 2008. **9**(11): p. 1039-47.
67. Michaud, D.S., et al., *Prediagnostic plasma C-peptide and pancreatic cancer risk in men and women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(10): p. 2101-9.
68. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox*. Cell Metab, 2008. **7**(2): p. 95-6.
69. Pollak, M., *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 915-28.
70. Frystyk, J., et al., *Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of type 2 diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 1999. **15**(5): p. 314-22.
71. Nunez, N.P., et al., *Obesity accelerates mouse mammary tumor growth in the absence of ovarian hormones*. Nutr Cancer, 2008. **60**(4): p. 534-41.
72. Papa, V., et al., *Elevated insulin receptor content in human breast cancer*. J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1503-10.
73. McCampbell, A.S., et al., *Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor and activation of the AKT pathway in hyperplastic endometrium*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6373-8.

74. Jiang, Y., et al., *A high expression level of insulin-like growth factor I receptor is associated with increased expression of transcription factor Sp1 and regional lymph node metastasis of human gastric cancer*. Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(8): p. 755-64.
75. Weber, M.M., et al., *Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas*. Cancer, 2002. **95**(10): p. 2086-95.
76. Nagle, J.A., et al., *Involvement of insulin receptor substrate 2 in mammary tumor metastasis*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(22): p. 9726-35.
77. Engelman, J.A., *Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 550-62.
78. Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag, *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 295-308.
79. Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini, *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(1): p. 21-35.
80. DiGiovanni, J., et al., *Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3455-60.
81. Bol, D.K., et al., *Overexpression of insulin-like growth factor-1 induces hyperplasia, dermal abnormalities, and spontaneous tumor formation in transgenic mice*. Oncogene, 1997. **14**(14): p. 1725-34.
82. Lopez, T. and D. Hanahan, *Elevated levels of IGF-1 receptor convey invasive and metastatic capability in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis*. Cancer Cell, 2002. **1**(4): p. 339-53.
83. Carboni, J.M., et al., *Tumor development by transgenic expression of a constitutively active insulin-like growth factor I receptor*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3781-7.
84. Moorehead, R.A., et al., *Transgenic overexpression of IGF-II induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma*. Oncogene, 2003. **22**(6): p. 853-7.
85. Pravtcheva, D.D. and T.L. Wise, *Metastasizing mammary carcinomas in H19 enhancers-Igf2 transgenic mice*. J Exp Zool, 1998. **281**(1): p. 43-57.

86. Frystyk, J., et al., *Bioactive insulin-like growth factor-I in obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(8): p. 3093-7.
87. Heald, A.H., et al., *Close relation of fasting insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) with glucose tolerance and cardiovascular risk in two populations*. Diabetologia, 2001. **44**(3): p. 333-9.
88. Kaaks, R., et al., *Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(19): p. 1592-600.
89. Wolpin, B.M., et al., *Insulin, the insulin-like growth factor axis, and mortality in patients with nonmetastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 176-85.
90. Osborne, C.K., et al., *Hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture: effect of insulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(12): p. 4536-40.
91. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
92. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 787-90.
93. Liou, G.Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. Free Radic Res, 2010. **44**(5): p. 479-96.
94. Esposito, K., et al., *Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress*. Circulation, 2002. **106**(16): p. 2067-72.
95. Ebbell, B., *The papyrus Ebers: The Greatest Egyptian Medical Document*. Levin & Munksgaard, 1937.
96. Hoption Cann, S.A., J.P. van Netten, and C. van Netten, *Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future*. Postgrad Med J, 2003. **79**(938): p. 672-80.
97. Busch, W., *Aus der Sitzung der medicinischen Section vom 13 November 1867*. Berl Klin Wochenschr.
98. Fehleisen, F., *Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen*. . Dtsch. Med. Wochenschr. , 1882. **8**: p. 553–554.

99. Nauts, H.C., W.E. Swift, and B.L. Coley, *The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research*. *Cancer Res*, 1946. **6**: p. 205-16.
100. Starnes, C.O., *Coley's toxins in perspective*. *Nature*, 1992. **357**(6373): p. 11-2.
101. Garcia-Castillo, V., et al., *Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle*. *J Med Microbiol*, 2016. **65**(12): p. 1347-1362.
102. Willyard, C., *Could baby's first bacteria take root before birth?* *Nature*, 2018. **553**(7688): p. 264-266.
103. Walker, R.W., et al., *The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero?* *Pediatr Obes*, 2017. **12 Suppl 1**: p. 3-17.
104. Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon, *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 837-48.
105. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. *Nature*, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
106. Thursby, E. and N. Juge, *Introduction to the human gut microbiota*. *Biochem J*, 2017. **474**(11): p. 1823-1836.
107. Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo, *Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body*. *PLoS Biol*, 2016. **14**(8): p. e1002533.
108. Kau, A.L., et al., *Human nutrition, the gut microbiome and the immune system*. *Nature*, 2011. **474**(7351): p. 327-36.
109. Cani, P.D., et al., *Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity*. *Gut Microbes*, 2012. **3**(4): p. 279-88.
110. Andriessen, E.M.M.A., et al., *Gut microbiota influences pathological angiogenesis in obesity-driven choroidal neovascularization*. *EMBO Molecular Medicine*, 2016.
111. Dapito, D.H., et al., *Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(4): p. 504-16.

112. Locey, K.J. and J.T. Lennon, *Scaling laws predict global microbial diversity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(21): p. 5970-5.
113. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, B.a., *A review of human carcinogens*. . IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum., 2012. **100 B** (100): p. 1-441.
114. Peek, R.M., Jr., *Helicobacter pylori strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis*. J Gastroenterol, 2002. **37 Suppl 13**: p. 10-6.
115. Organisation, W.H., *Schistosomes, Liver Flukes, and Helicobacter pylori: Infection with Helicobacter pylori*. . IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, ed. W.I.A.f.R.o. Cancer. Vol. 61. 1994: IARC Working Group. 177-240.
116. Wilson, M.R., et al., *The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA*. Science, 2019. **363**(6428).
117. Pleguezuelos-Manzano, C., et al., *Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks(+) E. coli*. Nature, 2020. **580**(7802): p. 269-273.
118. He, Z., et al., *Campylobacter jejuni promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin*. Gut, 2019. **68**(2): p. 289-300.
119. Barrett, M., et al., *Mutagenesis by Microbe: the Role of the Microbiota in Shaping the Cancer Genome*. Trends Cancer, 2020. **6**(4): p. 277-287.
120. Silva-Garcia, O., J.J. Valdez-Alarcon, and V.M. Baizabal-Aguirre, *Wnt/beta-Catenin Signaling as a Molecular Target by Pathogenic Bacteria*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2135.
121. Rubinstein, M.R., et al., *Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(2): p. 195-206.
122. Aykut, B., et al., *The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL*. Nature, 2019. **574**(7777): p. 264-267.
123. Jin, C., et al., *Commensal Microbiota Promote Lung Cancer Development via gamma delta T Cells*. Cell, 2019. **176**(5): p. 998-1013 e16.

124. Ma, C., et al., *Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells*. Science, 2018. **360**(6391).
125. Russo, E., et al., *The interplay between the microbiome and the adaptive immune response in cancer development*. Therap Adv Gastroenterol, 2016. **9**(4): p. 594-605.
126. Kadosh, E., et al., *The gut microbiome switches mutant p53 from tumour-suppressive to oncogenic*. Nature, 2020. **586**(7827): p. 133-138.
127. Cani, P.D. and B.F. Jordan, *Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **15**(11): p. 671-682.
128. Marzullo, P., et al., *Spot-light on microbiota in obesity and cancer*. Int J Obes (Lond), 2021. **45**(11): p. 2291-2299.
129. Muscogiuri, G., et al., *Gut microbiota: a new path to treat obesity*. Int J Obes Suppl, 2019. **9**(1): p. 10-19.
130. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
131. Turnbaugh, P.J., et al., *Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(4): p. 213-23.
132. Schwabe, R.F. and C. Jobin, *The microbiome and cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(11): p. 800-12.
133. Zitvogel, L., et al., *Microbiome and Anticancer Immunosurveillance*. Cell, 2016. **165**(2): p. 276-87.
134. Tjalsma, H., et al., *A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(8): p. 575-82.
135. Andriessen, E.M., et al., *Gut microbiota influences pathological angiogenesis in obesity-driven choroidal neovascularization*. EMBO Mol Med, 2016. **8**(12): p. 1366-1379.
136. Barb, D., et al., *Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(3): p. s858-66.

137. Fujisawa, T., et al., *Adiponectin suppresses colorectal carcinogenesis under the high-fat diet condition*. Gut, 2008. **57**(11): p. 1531-8.
138. Kaklamani, V., et al., *Polymorphisms of ADIPOQ and ADIPOR1 and prostate cancer risk*. Metabolism, 2011. **60**(9): p. 1234-43.
139. Kaklamani, V.G., et al., *Variants of the adiponectin and adiponectin receptor 1 genes and breast cancer risk*. Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3178-84.
140. Kaklamani, V.G., et al., *Variants of the adiponectin (ADIPOQ) and adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) genes and colorectal cancer risk*. JAMA, 2008. **300**(13): p. 1523-31.
141. Kamada, Y., et al., *Hypo adiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model*. J Hepatol, 2007. **47**(4): p. 556-64.
142. Kim, A.Y., et al., *Adiponectin represses colon cancer cell proliferation via AdipoR1- and -R2-mediated AMPK activation*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(7): p. 1441-52.
143. Lam, J.B., et al., *Adiponectin haploinsufficiency promotes mammary tumor development in MMTV-PyVT mice by modulation of phosphatase and tensin homolog activities*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4968.
144. Fogarty, S. and D.G. Hardie, *Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(3): p. 581-91.
145. Sharma, D., et al., *Adiponectin antagonizes the oncogenic actions of leptin in hepatocellular carcinogenesis*. Hepatology, 2010. **52**(5): p. 1713-22.
146. Sun, Y. and H.F. Lodish, *Adiponectin deficiency promotes tumor growth in mice by reducing macrophage infiltration*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e11987.
147. Cleary, M.P., et al., *Targeting the adiponectin:leptin ratio for postmenopausal breast cancer prevention*. Front Biosci (Schol Ed), 2009. **1**: p. 329-57.
148. Grossmann, M.E., et al., *Role of the adiponectin leptin ratio in prostate cancer*. Oncol Res, 2009. **18**(5-6): p. 269-77.
149. Rabe, K., et al., *Adipokines and insulin resistance*. Mol Med, 2008. **14**(11-12): p. 741-51.

150. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
151. Morrison, C.D., *Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition?* Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(5): p. 401-8.
152. Obradovic, M., et al., *Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 585887.
153. Howard, J.M., G.P. Pidgeon, and J.V. Reynolds, *Leptin and gastro-intestinal malignancies*. Obes Rev, 2010. **11**(12): p. 863-74.
154. Snoussi, K., et al., *Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 38.
155. Stattin, P., et al., *Leptin is associated with increased prostate cancer risk: a nested case-referent study*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 1341-5.
156. Tamakoshi, K., et al., *Leptin is associated with an increased female colorectal cancer risk: a nested case-control study in Japan*. Oncology, 2005. **68**(4-6): p. 454-61.
157. Lagiou, P., et al., *Leptin in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. Int J Cancer, 1998. **76**(1): p. 25-8.
158. Mantzoros, C.S., et al., *Leptin in relation to carcinoma in situ of the breast: a study of premenopausal cases and controls*. Int J Cancer, 1999. **80**(4): p. 523-6.
159. Banks, A.S., et al., *Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14563-72.
160. Choi, J.H., et al., *Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(1): p. 207-10.
161. Onuma, M., et al., *Prostate cancer cell-adipocyte interaction: leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 42660-7.
162. Catalano, S., et al., *Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19908-15.

163. Cao, R., et al., *Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6390-5.
164. Cascio, S., et al., *Mechanism of leptin expression in breast cancer cells: role of hypoxia-inducible factor-1alpha*. Oncogene, 2008. **27**(4): p. 540-7.
165. Newman, G. and R.R. Gonzalez-Perez, *Leptin-cytokine crosstalk in breast cancer*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **382**(1): p. 570-582.
166. Ando, S., et al., *The Multifaceted Mechanism of Leptin Signaling within Tumor Microenvironment in Driving Breast Cancer Growth and Progression*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 340.
167. Guo, S., et al., *Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1825**(2): p. 207-22.
168. Carbone, F., C. La Rocca, and G. Matarese, *Immunological functions of leptin and adiponectin*. Biochimie, 2012. **94**(10): p. 2082-8.
169. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
170. Deng, T., et al., *Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation*. Cell Metab, 2013. **17**(3): p. 411-22.
171. Avtanski, D., et al., *Resistin induces breast cancer cells epithelial to mesenchymal transition (EMT) and stemness through both adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1)-dependent and CAP1-independent mechanisms*. Cytokine, 2019. **120**: p. 155-164.
172. Cobia, B., et al., *A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis*. Obes Rev, 2016. **17**(4): p. 361-76.
173. Wang, C.H., et al., *Resistin facilitates breast cancer progression via TLR4-mediated induction of mesenchymal phenotypes and stemness properties*. Oncogene, 2018. **37**(5): p. 589-600.
174. de Luis, D., et al., *Effect of DHA supplementation in a very low-calorie ketogenic diet in the treatment of obesity: a randomized clinical trial*. Endocrine, 2016. **54**(1): p. 111-122.

175. Gomez-Arbelaez, D., et al., *Body Composition Changes After Very-Low-Calorie Ketogenic Diet in Obesity Evaluated by 3 Standardized Methods*. J Clin Endocrinol Metab, 2017. **102**(2): p. 488-498.
176. Sajoux, I., et al., *Effect of a Very-Low-Calorie Ketogenic Diet on Circulating Myokine Levels Compared with the Effect of Bariatric Surgery or a Low-Calorie Diet in Patients with Obesity*. Nutrients, 2019. **11**(10).
177. Beatson, G.T., *On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a New Method of Treatment, with Illustrative Cases*. Trans Med Chir Soc Edinb, 1896. **15**: p. 153-179.
178. Martin, M.B. and A. Stoica, *Insulin-like growth factor-I and estrogen interactions in breast cancer*. J Nutr, 2002. **132**(12): p. 3799S-3801S.
179. Deroo, B.J. and K.S. Korach, *Estrogen receptors and human disease*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 561-70.
180. Petrie, W.K., et al., *G protein-coupled estrogen receptor-selective ligands modulate endometrial tumor growth*. Obstet Gynecol Int, 2013. **2013**: p. 472720.
181. De Francesco, E.M., et al., *GPER mediates activation of HIF1alpha/VEGF signaling by estrogens*. Cancer Res, 2014. **74**(15): p. 4053-64.
182. Bulun, S.E., et al., *Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(2): p. 83-9.
183. Iyengar, N.M., et al., *Metabolic Obesity, Adipose Inflammation and Elevated Breast Aromatase in Women with Normal Body Mass Index*. Cancer Prev Res (Phila), 2017. **10**(4): p. 235-243.
184. Onstad, M.A., R.E. Schmandt, and K.H. Lu, *Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment*. J Clin Oncol, 2016. **34**(35): p. 4225-4230.
185. Agarwal, V.R., et al., *Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(11): p. 3843-9.

186. Mahendroo, M.S., C.R. Mendelson, and E.R. Simpson, *Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19463-70.
187. Zhao, Y., et al., *Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene*. Endocrinology, 1996. **137**(12): p. 5739-42.
188. Chen, D., et al., *Prostaglandin E(2) induces breast cancer related aromatase promoters via activation of p38 and c-Jun NH(2)-terminal kinase in adipose fibroblasts*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8914-22.
189. Clyne, C.D., et al., *Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20591-7.
190. Michael, M.D., L.F. Michael, and E.R. Simpson, *A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene*. Mol Cell Endocrinol, 1997. **134**(2): p. 147-56.
191. Safi, R., et al., *Coactivation of liver receptor homologue-1 by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha on aromatase promoter II and its inhibition by activated retinoid X receptor suggest a novel target for breast-specific antiestrogen therapy*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11762-70.
192. Samarajeewa, N.U., et al., *CREB-regulated transcription co-activator family stimulates promoter II-driven aromatase expression in preadipocytes*. Horm Cancer, 2013. **4**(4): p. 233-41.
193. Samarajeewa, N.U., et al., *HIF-1alpha stimulates aromatase expression driven by prostaglandin E2 in breast adipose stroma*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(2): p. R30.
194. Schonwasser, D.C., et al., *Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(2): p. 790-8.
195. Wang, X., E.R. Simpson, and K.A. Brown, *p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis*. Cancer Res, 2015. **75**(23): p. 5001-7.

196. Wang, X., et al., *Prostaglandin E2 inhibits p53 in human breast adipose stromal cells: a novel mechanism for the regulation of aromatase in obesity and breast cancer*. *Cancer Res*, 2015. **75**(4): p. 645-55.
197. Zahid, H., et al., *Leptin regulation of the p53-HIF1alpha/PKM2-aromatase axis in breast adipose stromal cells: a novel mechanism for the obesity-breast cancer link*. *Int J Obes (Lond)*, 2018. **42**(4): p. 711-720.
198. Singh, A., et al., *IL-6sR: release from MCF-7 breast cancer cells and role in regulating peripheral oestrogen synthesis*. *J Endocrinol*, 1995. **147**(2): p. R9-12.
199. To, S.Q., et al., *Involvement of early growth response factors in TNFalpha-induced aromatase expression in breast adipose*. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **138**(1): p. 193-203.
200. Park, J. and P.E. Scherer, *Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(11): p. 4243-56.
201. Johansen, J.S., *Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer*. *Dan Med Bull*, 2006. **53**(2): p. 172-209.
202. Rangaswami, H., A. Bulbule, and G.C. Kundu, *Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression*. *Trends Cell Biol*, 2006. **16**(2): p. 79-87.
203. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* *Lancet*, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
204. O'Flanagan, C.H., L.W. Bowers, and S.D. Hursting, *A weighty problem: metabolic perturbations and the obesity-cancer link*. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2015. **23**(2): p. 47-57.
205. Deng, T., et al., *Obesity, Inflammation, and Cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2016. **11**: p. 421-49.
206. Iyengar, N.M., et al., *Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(35): p. 4270-4276.
207. Kolb, R., F.S. Sutterwala, and W. Zhang, *Obesity and cancer: inflammation bridges the two*. *Curr Opin Pharmacol*, 2016. **29**: p. 77-89.

208. Leibovich, S.J., et al., *Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha*. Nature, 1987. **329**(6140): p. 630-2.
209. Park, E.J., et al., *Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression*. Cell, 2010. **140**(2): p. 197-208.
210. Moore, R.J., et al., *Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis*. Nat Med, 1999. **5**(7): p. 828-31.
211. Genard, G., S. Lucas, and C. Michiels, *Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages with Anticancer Therapies: Radiotherapy versus Chemo- and Immunotherapies*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 828.
212. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
213. Hinshaw, D.C. and L.A. Shevde, *The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression*. Cancer Res, 2019. **79**(18): p. 4557-4566.
214. Jain, S.S. and R.P. Bird, *Elevated expression of tumor necrosis factor-alpha signaling molecules in colonic tumors of Zucker obese (fa/fa) rats*. Int J Cancer, 2010. **127**(9): p. 2042-50.
215. Kern, P.A., et al., *Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(5): p. E745-51.
216. Bowen, W.S., et al., *Selective TRIF-dependent signaling by a synthetic toll-like receptor 4 agonist*. Sci Signal, 2012. **5**(211): p. ra13.
217. Orosz, P., et al., *Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1993. **177**(5): p. 1391-8.
218. Naugler, W.E., et al., *Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production*. Science, 2007. **317**(5834): p. 121-4.
219. Lewis, A.M., et al., *Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment*. J Transl Med, 2006. **4**: p. 48.

220. Xu, J., et al., *Systematic review and meta-analysis on the association between IL-1B polymorphisms and cancer risk*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63654.
221. Naugler, W.E. and M. Karin, *The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer*. Trends Mol Med, 2008. **14**(3): p. 109-19.
222. Mohamed-Ali, V., et al., *Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4196-200.
223. Bromberg, J.F., et al., *Stat3 as an oncogene*. Cell, 1999. **98**(3): p. 295-303.
224. Ghosh, S. and K. Ashcraft, *An IL-6 link between obesity and cancer*. Front Biosci (Elite Ed), 2013. **5**: p. 461-78.
225. Dano, K., et al., *Plasminogen activation and cancer*. Thromb Haemost, 2005. **93**(4): p. 676-81.
226. Ferrara, N., *Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(5): p. 687-90.
227. Egeblad, M., E.S. Nakasone, and Z. Werb, *Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism*. Dev Cell, 2010. **18**(6): p. 884-901.
228. Foekens, J.A., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer*. J Clin Oncol, 1994. **12**(8): p. 1648-58.
229. Mutoh, M., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1) blockers suppress intestinal polyp formation in Min mice*. Carcinogenesis, 2008. **29**(4): p. 824-9.
230. Bajou, K., et al., *Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization*. Nat Med, 1998. **4**(8): p. 923-8.
231. Bajou, K., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis*. Cancer Cell, 2008. **14**(4): p. 324-34.
232. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.

233. Bredel, M., et al., *NFKBIA deletion in glioblastomas*. N Engl J Med, 2011. **364**(7): p. 627-37.
234. Calado, D.P., et al., *Constitutive canonical NF-kappaB activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma*. Cancer Cell, 2010. **18**(6): p. 580-9.
235. Wang, W., et al., *The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(1): p. 119-27.
236. Wunderlich, F.T., et al., *Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1297-302.
237. Verzella, D., et al., *Life, death, and autophagy in cancer: NF-kappaB turns up everywhere*. Cell Death Dis, 2020. **11**(3): p. 210.
238. Lentz, A.K. and R.J. Feezor, *Principles of immunology*. Nutr Clin Pract, 2003. **18**(6): p. 451-60.
239. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. ed. Principles of innate and adaptive immunity. Vol. . 2001, New York: Garland Science
240. Pollard, A.J. and E.M. Bijker, *A guide to vaccinology: from basic principles to new developments*. Nat Rev Immunol, 2021. **21**(2): p. 83-100.
241. Netea, M.G., et al., *Defining trained immunity and its role in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(6): p. 375-388.
242. Leentjens, J., et al., *Trained Innate Immunity as a Novel Mechanism Linking Infection and the Development of Atherosclerosis*. Circ Res, 2018. **122**(5): p. 664-669.
243. Musher, D.M., M.S. Abers, and V.F. Corrales-Medina, *Acute Infection and Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2019. **380**(2): p. 171-176.

244. Bekkering, S., et al., *Innate immune cell activation and epigenetic remodeling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo*. *Atherosclerosis*, 2016. **254**: p. 228-236.
245. Christ, A., et al., *Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming*. *Cell*, 2018. **172**(1-2): p. 162-175 e14.
246. Bekkering, S., et al., *Treatment with Statins Does Not Revert Trained Immunity in Patients with Familial Hypercholesterolemia*. *Cell Metab*, 2019. **30**(1): p. 1-2.
247. Frost, P.S., et al., *Neonatal infection leads to increased susceptibility to Abeta oligomer-induced brain inflammation, synapse loss and cognitive impairment in mice*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(4): p. 323.
248. Ransohoff, R.M., *How neuroinflammation contributes to neurodegeneration*. *Science*, 2016. **353**(6301): p. 777-83.
249. Wendeln, A.C., et al., *Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks*. *Nature*, 2018. **556**(7701): p. 332-338.
250. Braza, M.S., et al., *Inhibiting Inflammation with Myeloid Cell-Specific Nanobiologics Promotes Organ Transplant Acceptance*. *Immunity*, 2018. **49**(5): p. 819-828 e6.
251. Jurado-Camino, T., et al., *Chronic lymphocytic leukemia: a paradigm of innate immune cross-tolerance*. *J Immunol*, 2015. **194**(2): p. 719-27.
252. Kalafati, L., et al., *Innate Immune Training of Granulopoiesis Promotes Anti-tumor Activity*. *Cell*, 2020. **183**(3): p. 771-785 e12.
253. Pauken, K.E., et al., *Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade*. *Science*, 2016. **354**(6316): p. 1160-1165.
254. Rabold, K., et al., *Cellular metabolism of tumor-associated macrophages - functional impact and consequences*. *FEBS Lett*, 2017. **591**(19): p. 3022-3041.
255. Christ, A. and E. Latz, *The Western lifestyle has lasting effects on metaflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2019. **19**(5): p. 267-268.

256. Bekkering, S., et al., *Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(8): p. 1731-8.
257. van der Valk, F.M., et al., *Oxidized Phospholipids on Lipoprotein(a) Elicit Arterial Wall Inflammation and an Inflammatory Monocyte Response in Humans*. *Circulation*, 2016. **134**(8): p. 611-24.
258. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
259. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
260. Nishimura, S., et al., *CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 914-20.
261. McNelis, J.C. and J.M. Olefsky, *Macrophages, immunity, and metabolic disease*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 36-48.
262. Wensveen, F.M., et al., *NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(4): p. 376-85.
263. Kosteli, A., et al., *Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(10): p. 3466-79.
264. Dallavalasa, S., et al., *The Role of Tumor Associated Macrophages (TAMs) in Cancer Progression, Chemoresistance, Angiogenesis and Metastasis - Current Status*. *Curr Med Chem*, 2021. **28**(39): p. 8203-8236.
265. Noy, R. and J.W. Pollard, *Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 49-61.
266. Coussens, L.M., L. Zitvogel, and A.K. Palucka, *Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet?* *Science*, 2013. **339**(6117): p. 286-91.
267. DeNardo, D.G., et al., *CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(2): p. 91-102.

268. Gocheva, V., et al., *IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion*. Genes Dev, 2010. **24**(3): p. 241-55.
269. Lin, E.Y., et al., *The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002. **7**(2): p. 147-62.
270. Su, S., et al., *A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis*. Cancer Cell, 2014. **25**(5): p. 605-20.
271. Motz, G.T. and G. Coukos, *The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(10): p. 702-11.
272. Flores Villanueva, P.O., H. Reiser, and M.J. Staderker, *Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophages*. J Immunol, 1994. **153**(11): p. 5190-9.
273. Greaves, P. and J.G. Gribben, *The role of B7 family molecules in hematologic malignancy*. Blood, 2013. **121**(5): p. 734-44.
274. Loke, P. and J.P. Allison, *PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5336-41.
275. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
276. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
277. Yang, L., et al., *Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 23-35.
278. Dyck, L., et al., *Suppressive effects of the obese tumor microenvironment on CD8 T cell infiltration and effector function*. J Exp Med, 2022. **219**(3).
279. Ringel, A.E., et al., *Obesity Shapes Metabolism in the Tumor Microenvironment to Suppress Anti-Tumor Immunity*. Cell, 2020. **183**(7): p. 1848-1866 e26.
280. cancer, S.c.d. *Traitements*. 2022 [cited 2022 2022-03-08]; Available from: <https://cancer.ca/fr/treatments/treatment-types>.

281. DeVita, V.T., Jr. and E. Chu, *A history of cancer chemotherapy*. *Cancer Res*, 2008. **68**(21): p. 8643-53.
282. Chen, H.H.W. and M.T. Kuo, *Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges*. *Oncotarget*, 2017. **8**(37): p. 62742-62758.
283. Le, Q.T., et al., *Emerging Treatment Paradigms in Radiation Oncology*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(15): p. 3393-401.
284. DeVita, V.T., Jr., *The evolution of therapeutic research in cancer*. *N Engl J Med*, 1978. **298**(16): p. 907-10.
285. Papac, R.J., *Origins of cancer therapy*. *Yale J Biol Med*, 2001. **74**(6): p. 391-8.
286. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2011. **10**(6): p. 417-27.
287. Jain, R.K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. *Science*, 2005. **307**(5706): p. 58-62.
288. Morrison, R., et al., *Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis*. *J Oncol*, 2011. **2011**: p. 941876.
289. Ewald, J.A., et al., *Therapy-induced senescence in cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2010. **102**(20): p. 1536-46.
290. Moore, A.E., *The destructive effect of the virus of Russian Far East encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180*. *Cancer*, 1949. **2**(3): p. 525-34.
291. Moore, A.E., *Effect of inoculation of the viruses of influenza A and herpes simplex on the growth of transplantable tumors in mice*. *Cancer*, 1949. **2**(3): p. 516-24.
292. Lichty, B.D., et al., *Going viral with cancer immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2014. **14**(8): p. 559-67.
293. Cook, M. and A. Chauhan, *Clinical Application of Oncolytic Viruses: A Systematic Review*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(20).
294. Amgen. *FDA Approves IMLYGICTM (Talimogene Laherparepvic) as First Oncolytic Viral Therapy in the US*. 2015 [cited 2022 2022-03-07]; Available from:

<https://www.prnewswire.com/news-releases/fda-approves-imlygic-talimogene-laherparepvec-as-first-oncolytic-viral-therapy-in-the-us-300167270.html>

295. Kaufman, H.L., F.J. Kohlhapp, and A. Zloza, *Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs*. *Nat Rev Drug Discov*, 2015. **14**(9): p. 642-62.
296. Bofill-De Ros, X., M. Rovira-Rigau, and C. Fillat, *Implications of MicroRNAs in Oncolytic Virotherapy*. *Front Oncol*, 2017. **7**: p. 142.
297. Guedan, S., et al., *Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth*. *Mol Ther*, 2010. **18**(7): p. 1275-83.
298. Li, J.L., et al., *A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients*. *Gene Ther*, 2009. **16**(3): p. 376-82.
299. Mastrangelo, M.J., et al., *Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma*. *Cancer Gene Ther*, 1999. **6**(5): p. 409-22.
300. Toda, M., R.L. Martuza, and S.D. Rabkin, *Tumor growth inhibition by intratumoral inoculation of defective herpes simplex virus vectors expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. *Mol Ther*, 2000. **2**(4): p. 324-9.
301. Deguchi, T., et al., *Combination of the tumor angiogenesis inhibitor bevacizumab and intratumoral oncolytic herpes virus injections as a treatment strategy for human gastric cancers*. *Hepatogastroenterology*, 2012. **59**(118): p. 1844-50.
302. Ganesh, S., et al., *Combination therapy with radiation or cisplatin enhances the potency of Ad5/35 chimeric oncolytic adenovirus in a preclinical model of head and neck cancer*. *Cancer Gene Ther*, 2009. **16**(5): p. 383-92.
303. Xia, Z.J., et al., *[Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (HI01) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus]*. *Ai Zheng*, 2004. **23**(12): p. 1666-70.

304. Victor A. Naumenko, A.A.S., Anastasiia V. Lipatova, Daniil A. Vishnevskiy, Vladimir P. Chekhonin, *Infection of non-cancer cells: A barrier or support for oncolytic virotherapy?* Molecular Therapy - Oncolytics, 2022.
305. Martuza, R.L., et al., *Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant.* Science, 1991. **252**(5007): p. 854-6.
306. Kaufman, H.L., et al., *Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma.* Ann Surg Oncol, 2010. **17**(3): p. 718-30.
307. Di Paolo, N.C., et al., *Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo.* Immunity, 2009. **31**(1): p. 110-21.
308. Kanerva, A., et al., *Antiviral and antitumor T-cell immunity in patients treated with GM-CSF-coding oncolytic adenovirus.* Clin Cancer Res, 2013. **19**(10): p. 2734-44.
309. Xu, R., et al., *Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice.* J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6265-71.
310. Blankenstein, T., et al., *The determinants of tumour immunogenicity.* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 307-13.
311. Medler, T.R., et al., *Defining Immunogenic and Radioimmunogenic Tumors.* Front Oncol, 2021. **11**: p. 667075.
312. Prehn, R.T. and J.M. Main, *Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas.* J Natl Cancer Inst, 1957. **18**(6): p. 769-78.
313. Hewitt, H.B., E.R. Blake, and A.S. Walder, *A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin.* Br J Cancer, 1976. **33**(3): p. 241-59.
314. Mosely, S.I., et al., *Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery.* Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 29-41.
315. Bertram, J.S. and P. Janik, *Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture.* Cancer Lett, 1980. **11**(1): p. 63-73.

316. Lechner, M.G., et al., *Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy*. J Immunother, 2013. **36**(9): p. 477-89.
317. Boon, T. and O. Kellermann, *Rejection by syngeneic mice of cell variants obtained by mutagenesis of a malignant teratocarcinoma cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(1): p. 272-5.
318. Uyttenhove, C., J. Van Snick, and T. Boon, *Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. I. Rejection by syngeneic mice*. J Exp Med, 1980. **152**(5): p. 1175-83.
319. Van Pel, A. and T. Boon, *Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(15): p. 4718-22.
320. Van Pel, A., M. Georlette, and T. Boon, *Tumor cell variants obtained by mutagenesis of a Lewis lung carcinoma cell line: immune rejection by syngeneic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(10): p. 5282-5.
321. Klebanoff, C.A., et al., *Determinants of successful CD8+ T-cell adoptive immunotherapy for large established tumors in mice*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(16): p. 5343-52.
322. Quezada, S.A., et al., *CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1935-45.
323. Curran, M.A., et al., *PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4275-80.
324. Ding, T., et al., *High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection*. Hum Pathol, 2009. **40**(3): p. 381-9.
325. Awad, R.M., et al., *Turn Back the TIME: Targeting Tumor Infiltrating Myeloid Cells to Revert Cancer Progression*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1977.

326. DeNardo, D.G., P. Andreu, and L.M. Coussens, *Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity*. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. **29**(2): p. 309-16.
327. Zhang, Q., et al., *Neutrophil-to-lymphocyte ratio correlates with prognosis and response to chemotherapy in patients with non-M3 de novo acute myeloid leukemia*. *Transl Cancer Res*, 2021. **10**(2): p. 1013-1024.
328. cancer, S.c.d. *Immunothérapie*. 2022 [cited 2022 2022-02-10]; Available from: <https://cancer.ca/fr/treatments/treatment-types/immunotherapy>.
329. June, C.H., et al., *CAR T cell immunotherapy for human cancer*. *Science*, 2018. **359**(6382): p. 1361-1365.
330. Sadelain, M., R. Brentjens, and I. Riviere, *The basic principles of chimeric antigen receptor design*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(4): p. 388-98.
331. Maude, S.L., et al., *Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(5): p. 439-448.
332. Neelapu, S.S., et al., *Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(26): p. 2531-2544.
333. Schuster, S.J., et al., *Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(26): p. 2545-2554.
334. Korman, A.J., S.C. Garrett-Thomson, and N. Lonberg, *The foundations of immune checkpoint blockade and the ipilimumab approval decennial*. *Nat Rev Drug Discov*, 2021.
335. Wei, S.C., C.R. Duffy, and J.P. Allison, *Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy*. *Cancer Discov*, 2018. **8**(9): p. 1069-1086.
336. Kumar, B.V., T.J. Connors, and D.L. Farber, *Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life*. *Immunity*, 2018. **48**(2): p. 202-213.
337. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 329-60.

338. Zou, W., J.D. Wolchok, and L. Chen, *PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations*. *Sci Transl Med*, 2016. **8**(328): p. 328rv4.
339. Hodi, F.S., et al., *Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(11): p. 1558-1568.
340. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(1): p. 23-34.
341. Topalian, S.L., et al., *Immunotherapy: The path to win the war on cancer?* *Cell*, 2015. **161**(2): p. 185-6.
342. Sindoni, A., et al., *Combination of immune checkpoint inhibitors and radiotherapy: Review of the literature*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017. **113**: p. 63-70.
343. Adams, S., *Toll-like receptor agonists in cancer therapy*. *Immunotherapy*, 2009. **1**(6): p. 949-64.
344. Braunstein, M.J., J. Kucharczyk, and S. Adams, *Targeting Toll-Like Receptors for Cancer Therapy*. *Target Oncol*, 2018. **13**(5): p. 583-598.
345. Schreibelt, G., et al., *Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. **59**(10): p. 1573-82.
346. Cen, X., S. Liu, and K. Cheng, *The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and Tumor Immunity*. *Front Pharmacol*, 2018. **9**: p. 878.
347. Vacchelli, E., et al., *Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy*. *Oncoimmunology*, 2012. **1**(6): p. 894-907.
348. Akbari, R., et al., *Production of Brucella lumazine Synthase Recombinant Protein to Design a Subunit Vaccine against Undulant Fever*. *Arch Razi Inst*, 2019. **74**(1): p. 1-6.
349. Farias, A., et al., *A TLR4 agonist improves immune checkpoint blockade treatment by increasing the ratio of effector to regulatory cells within the tumor microenvironment*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 15406.

350. Pierre, P., et al., *Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 787-92.
351. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 351-8.
352. Xing, Y. and K.A. Hogquist, *T-cell tolerance: central and peripheral*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(6).
353. Darrasse-Jeze, G., et al., *Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 1853-62.
354. Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1219-27.
355. Yamazaki, S., et al., *CD8⁺ CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6923-33.
356. Yogev, N., et al., *Dendritic cells ameliorate autoimmunity in the CNS by controlling the homeostasis of PD-1 receptor(+) regulatory T cells*. Immunity, 2012. **37**(2): p. 264-75.
357. Morelli, A.E. and A.W. Thomson, *Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(8): p. 610-21.
358. Vogel, A., et al., *JAK1 signaling in dendritic cells promotes peripheral tolerance in autoimmunity through PD-L1-mediated regulatory T cell induction*. Cell Rep, 2022. **38**(8): p. 110420.
359. Jackson, S.H., et al., *Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2307-15.
360. Johnson, L.M. and P. Scott, *STAT1 expression in dendritic cells, but not T cells, is required for immunity to Leishmania major*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7259-66.
361. Jeong, H., et al., *Potential of Mycobacterium tuberculosis chorismate mutase (Rv1885c) as a novel TLR4-mediated adjuvant for dendritic cell-based cancer immunotherapy*. Oncoimmunology, 2022. **11**(1): p. 2023340.

362. Yin, H., et al., *Gut-derived lipopolysaccharide remodels tumoral microenvironment and synergizes with PD-L1 checkpoint blockade via TLR4/MyD88/AKT/NF-kappaB pathway in pancreatic cancer*. Cell Death Dis, 2021. **12**(11): p. 1033.
363. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
364. Beausejour, C.M., et al., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways*. EMBO J, 2003. **22**(16): p. 4212-22.
365. Milanovic, M., et al., *Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness*. Nature, 2018. **553**(7686): p. 96-100.
366. Sage, J., et al., *Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry*. Nature, 2003. **424**(6945): p. 223-8.
367. Yu, Y., et al., *Targeting the Senescence-Overriding Cooperative Activity of Structurally Unrelated H3K9 Demethylases in Melanoma*. Cancer Cell, 2018. **33**(4): p. 785.
368. Storer, M., et al., *Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1119-30.
369. Munoz-Espin, D., et al., *Programmed cell senescence during mammalian embryonic development*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1104-18.
370. Demaria, M., et al., *An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA*. Dev Cell, 2014. **31**(6): p. 722-33.
371. Yun, M.H., H. Davaapil, and J.P. Brookes, *Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure*. Elife, 2015. **4**.
372. Chandeck, C. and W.J. Mooi, *Oncogene-induced cellular senescence*. Adv Anat Pathol, 2010. **17**(1): p. 42-8.
373. Liu, J., et al., *Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing*. Cells, 2019. **8**(1).
374. Gorgoulis, V., et al., *Cellular Senescence: Defining a Path Forward*. Cell, 2019. **179**(4): p. 813-827.

375. He, S. and N.E. Sharpless, *Senescence in Health and Disease*. Cell, 2017. **169**(6): p. 1000-1011.
376. Lee, S. and C.A. Schmitt, *The dynamic nature of senescence in cancer*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(1): p. 94-101.
377. Munoz-Espin, D. and M. Serrano, *Cellular senescence: from physiology to pathology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(7): p. 482-96.
378. Hernandez-Segura, A., J. Nehme, and M. Demaria, *Hallmarks of Cellular Senescence*. Trends Cell Biol, 2018. **28**(6): p. 436-453.
379. Gonzalez-Gualda, E., et al., *A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo*. FEBS J, 2021. **288**(1): p. 56-80.
380. Krishna, D.R., et al., *Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence?* Mech Ageing Dev, 1999. **109**(2): p. 113-23.
381. Tanaka, H., M. Meisler, and K. Suzuki, *Activity of human hepatic beta-galactosidase toward natural glycosphingolipid substrates*. Biochim Biophys Acta, 1975. **398**(3): p. 452-63.
382. Kurz, D.J., et al., *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 20): p. 3613-22.
383. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 187-95.
384. Zhang, Z., et al., *Role of lysosomes in physiological activities, diseases, and therapy*. J Hematol Oncol, 2021. **14**(1): p. 79.
385. Asanuma, D., et al., *Sensitive beta-galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours in vivo*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6463.
386. Brunner, N., et al., *lacZ transduced human breast cancer xenografts as an in vivo model for the study of invasion and metastasis*. Eur J Cancer, 1992. **28A**(12): p. 1989-95.
387. Chatterjee, S.K., M. Bhattacharya, and J.J. Barlow, *Glycosyltransferase and glycosidase activities in ovarian cancer patients*. Cancer Res, 1979. **39**(6 Pt 1): p. 1943-51.

388. Olszewska, E., et al., *Possible role of alpha-mannosidase and beta-galactosidase in larynx cancer*. Contemp Oncol (Pozn), 2012. **16**(2): p. 154-8.
389. Wielgat, P., et al., *Activity of lysosomal exoglycosidases in human gliomas*. J Neurooncol, 2006. **80**(3): p. 243-9.
390. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
391. Trim, W., J.E. Turner, and D. Thompson, *Parallels in Immunometabolic Adipose Tissue Dysfunction with Ageing and Obesity*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 169.
392. Perez, L.M., et al., *'Adipaging': ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue*. J Physiol, 2016. **594**(12): p. 3187-207.
393. Tchkonja, T., et al., *Fat tissue, aging, and cellular senescence*. Aging Cell, 2010. **9**(5): p. 667-84.
394. Tzanetakou, I.P., et al., *"Is obesity linked to aging?": adipose tissue and the role of telomeres*. Ageing Res Rev, 2012. **11**(2): p. 220-9.
395. An, R. and H. Yan, *Body weight status and telomere length in U.S. middle-aged and older adults*. Obes Res Clin Pract, 2017. **11**(1): p. 51-62.
396. Hang, D., et al., *Longitudinal associations of lifetime adiposity with leukocyte telomere length and mitochondrial DNA copy number*. Eur J Epidemiol, 2018. **33**(5): p. 485-495.
397. Horvath, S., et al., *Obesity accelerates epigenetic aging of human liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(43): p. 15538-43.
398. Nevalainen, T., et al., *Obesity accelerates epigenetic aging in middle-aged but not in elderly individuals*. Clin Epigenetics, 2017. **9**: p. 20.
399. Quach, A., et al., *Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors*. Aging (Albany NY), 2017. **9**(2): p. 419-446.
400. Yousefzadeh, M.J., et al., *An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs*. Nature, 2021. **594**(7861): p. 100-105.

401. Akbar, A.N. and J.M. Fletcher, *Memory T cell homeostasis and senescence during aging*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(5): p. 480-5.
402. Effros, R.B., *Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing*. *Exp Gerontol*, 2004. **39**(4): p. 517-24.
403. Janelle, V., et al., *p16(INK4a) Regulates Cellular Senescence in PD-1-Expressing Human T Cells*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 698565.
404. Nikolich-Zugich, J., *Aging of the T cell compartment in mice and humans: from no naive expectations to foggy memories*. *J Immunol*, 2014. **193**(6): p. 2622-9.
405. Ferrara, R., et al., *Immunosenescence and immunecheckpoint inhibitors in non-small cell lung cancer patients: Does age really matter?* *Cancer Treat Rev*, 2017. **60**: p. 60-68.
406. Plowden, J., et al., *Innate immunity in aging: impact on macrophage function*. *Aging Cell*, 2004. **3**(4): p. 161-7.
407. Dall'Olio, F.G., et al., *Tumour burden and efficacy of immune-checkpoint inhibitors*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022. **19**(2): p. 75-90.
408. Ogrodnik, M., et al., *Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15691.
409. Ogrodnik, M., et al., *Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis*. *Cell Metab*, 2019. **29**(5): p. 1233.
410. Palmer, A.K., et al., *Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction*. *Aging Cell*, 2019. **18**(3): p. e12950.
411. Chatsirisupachai, K., et al., *A human tissue-specific transcriptomic analysis reveals a complex relationship between aging, cancer, and cellular senescence*. *Aging Cell*, 2019. **18**(6): p. e13041.
412. Minamino, T., et al., *A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance*. *Nat Med*, 2009. **15**(9): p. 1082-7.
413. Chen, Y.W., et al., *Ablation of XP-V gene causes adipose tissue senescence and metabolic abnormalities*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(33): p. E4556-64.

414. Schafer, M.J., et al., *Exercise Prevents Diet-Induced Cellular Senescence in Adipose Tissue*. Diabetes, 2016. **65**(6): p. 1606-15.
415. Vergoni, B., et al., *DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes*. Diabetes, 2016. **65**(10): p. 3062-74.
416. Rouault, C., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase in subcutaneous adipose tissue associates with altered glycaemic status and truncal fat in severe obesity*. Diabetologia, 2021. **64**(1): p. 240-254.
417. Li, Q., et al., *Obesity and hyperinsulinemia drive adipocytes to activate a cell cycle program and senesce*. Nat Med, 2021. **27**(11): p. 1941-1953.
418. Gustafson, B., A. Nerstedt, and U. Smith, *Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2757.
419. Mitterberger, M.C., et al., *Adipogenic differentiation is impaired in replicative senescent human subcutaneous adipose-derived stromal/progenitor cells*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014. **69**(1): p. 13-24.
420. Xu, M., et al., *Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age*. Elife, 2015. **4**: p. e12997.
421. Xu, M., et al., *JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(46): p. E6301-10.
422. Acosta, J.R., et al., *Increased fat cell size: a major phenotype of subcutaneous white adipose tissue in non-obese individuals with type 2 diabetes*. Diabetologia, 2016. **59**(3): p. 560-70.
423. Arner, P., et al., *Genetic predisposition for Type 2 diabetes, but not for overweight/obesity, is associated with a restricted adipogenesis*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18284.
424. Smith, U. and B.B. Kahn, *Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids*. J Intern Med, 2016. **280**(5): p. 465-475.
425. Gogg, S., et al., *Human adipose tissue microvascular endothelial cells secrete PPARgamma ligands and regulate adipose tissue lipid uptake*. JCI Insight, 2019. **4**(5).

426. Kanda, T., et al., *PPARgamma in the endothelium regulates metabolic responses to high-fat diet in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 110-24.
427. Briot, A., et al., *Senescence Alters PPARgamma (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)-Dependent Fatty Acid Handling in Human Adipose Tissue Microvascular Endothelial Cells and Favors Inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018. **38**(5): p. 1134-1146.
428. Wang, B., J. Kohli, and M. Demaria, *Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes?* Trends Cancer, 2020. **6**(10): p. 838-857.
429. Kang, T.W., et al., *Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development*. Nature, 2011. **479**(7374): p. 547-51.
430. Faget, D.V., Q. Ren, and S.A. Stewart, *Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(8): p. 439-453.
431. Xue, W., et al., *Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 656-60.
432. Burton, D.G.A. and A. Stolzing, *Cellular senescence: Immunosurveillance and future immunotherapy*. Ageing Res Rev, 2018. **43**: p. 17-25.
433. Mehdizadeh, M., et al., *The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance*. Nat Rev Cardiol, 2021.
434. Schafer, M.J., J.D. Miller, and N.K. LeBrasseur, *Cellular senescence: Implications for metabolic disease*. Mol Cell Endocrinol, 2017. **455**: p. 93-102.
435. Martinez-Cue, C. and N. Rueda, *Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases*. Front Cell Neurosci, 2020. **14**: p. 16.
436. Coryell, P.R., B.O. Diekmann, and R.F. Loeser, *Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2021. **17**(1): p. 47-57.
437. Farr, J.N. and S. Khosla, *Cellular senescence in bone*. Bone, 2019. **121**: p. 121-133.
438. He, Y., et al., *Cellular Senescence in Sarcopenia: Possible Mechanisms and Therapeutic Potential*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 793088.

439. Eggert, T., et al., *Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(4): p. 533-547.
440. Coppe, J.P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. *Annu Rev Pathol*, 2010. **5**: p. 99-118.
441. Oubaha, M., et al., *Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy*. *Science Translational Medicine*, 2016. **8**(362): p. 362ra144-362ra144.
442. Binet, F., et al., *Neutrophil extracellular traps target senescent vasculature for tissue remodeling in retinopathy*. *Science*, 2020. **369**(6506).
443. Crespo-Garcia, S., et al., *Pathological angiogenesis in retinopathy engages cellular senescence and is amenable to therapeutic elimination via BCL-xL inhibition*. *Cell Metab*, 2021. **33**(4): p. 818-832 e7.
444. Zhou, T.E., et al., *The Inability of the Choroid to Revascularize in Oxygen-Induced Retinopathy Results from Increased p53/miR-Let-7b Activity*. *Am J Pathol*, 2019. **189**(11): p. 2340-2356.
445. Basisty, N., et al., *A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development*. *PLoS Biol*, 2020. **18**(1): p. e3000599.
446. Hernandez-Segura, A., et al., *Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells*. *Curr Biol*, 2017. **27**(17): p. 2652-2660 e4.
447. Wiley, C.D., et al., *Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence*. *Aging Cell*, 2017. **16**(5): p. 1043-1050.
448. Salama, R., et al., *Cellular senescence and its effector programs*. *Genes Dev*, 2014. **28**(2): p. 99-114.
449. Hoare, M., et al., *NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence*. *Nat Cell Biol*, 2016. **18**(9): p. 979-92.
450. Coppe, J.P., et al., *Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(42): p. 36396-403.

451. Rodier, F., et al., *Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(8): p. 973-9.
452. Cuollo, L., et al., *The Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases*. Biology (Basel), 2020. **9**(12).
453. Freund, A., C.K. Patil, and J. Campisi, *p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype*. EMBO J, 2011. **30**(8): p. 1536-48.
454. Teo, Y.V., et al., *Notch Signaling Mediates Secondary Senescence*. Cell Rep, 2019. **27**(4): p. 997-1007 e5.
455. Herranz, N., et al., *mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(9): p. 1205-17.
456. Moiseeva, O., et al., *Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(16): p. 4495-507.
457. Passos, J.F., et al., *Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence*. PLoS Biol, 2007. **5**(5): p. e110.
458. Nacarelli, T., et al., *NAD(+) metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(3): p. 397-407.
459. Aird, K.M., et al., *HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci*. J Cell Biol, 2016. **215**(3): p. 325-334.
460. Casella, G., et al., *Transcriptome signature of cellular senescence*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(14): p. 7294-7305.
461. Fridman, A.L. and M.A. Tainsky, *Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling*. Oncogene, 2008. **27**(46): p. 5975-87.
462. Purcell, M., A. Kruger, and M.A. Tainsky, *Gene expression profiling of replicative and induced senescence*. Cell Cycle, 2014. **13**(24): p. 3927-37.

463. Carroll, J.E., J.E. Bower, and P.A. Ganz, *Cancer-related accelerated ageing and biobehavioural modifiers: a framework for research and clinical care*. Nat Rev Clin Oncol, 2021.
464. Bower, J.E. and P.A. Ganz, *Symptoms: Fatigue and Cognitive Dysfunction*. Adv Exp Med Biol, 2015. **862**: p. 53-75.
465. Mandelblatt, J.S., et al., *Cognitive effects of cancer and its treatments at the intersection of aging: what do we know; what do we need to know?* Semin Oncol, 2013. **40**(6): p. 709-25.
466. Alspach, E., Y. Fu, and S.A. Stewart, *Senescence and the pro-tumorigenic stroma*. Crit Rev Oncog, 2013. **18**(6): p. 549-58.
467. Hassona, Y., et al., *Senescent cancer-associated fibroblasts secrete active MMP-2 that promotes keratinocyte dis-cohesion and invasion*. Br J Cancer, 2014. **111**(6): p. 1230-7.
468. Tan, M.L., et al., *Autophagy is deregulated in cancer-associated fibroblasts from oral cancer and is stimulated during the induction of fibroblast senescence by TGF-beta1*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 584.
469. Yasuda, T., et al., *Inflammation-driven senescence-associated secretory phenotype in cancer-associated fibroblasts enhances peritoneal dissemination*. Cell Rep, 2021. **34**(8): p. 108779.
470. Meng, J., et al., *Targeting senescence-like fibroblasts radiosensitizes non-small cell lung cancer and reduces radiation-induced pulmonary fibrosis*. JCI Insight, 2021. **6**(23).
471. Ruhland, M.K., et al., *Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11762.
472. Hwang, H.J., et al., *Endothelial cells under therapy-induced senescence secrete CXCL11, which increases aggressiveness of breast cancer cells*. Cancer Lett, 2020. **490**: p. 100-110.
473. Wang, D., et al., *Sunitinib facilitates metastatic breast cancer spreading by inducing endothelial cell senescence*. Breast Cancer Res, 2020. **22**(1): p. 103.
474. Schosserer, M., J. Grillari, and M. Breitenbach, *The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 278.

475. Perez-Mancera, P.A., A.R. Young, and M. Narita, *Inside and out: the activities of senescence in cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(8): p. 547-58.
476. Schmitt, C.A., et al., *A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy*. Cell, 2002. **109**(3): p. 335-46.
477. Lee, M. and J.S. Lee, *Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy*. BMB Rep, 2014. **47**(2): p. 51-9.
478. Haugstetter, A.M., et al., *Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer*. Br J Cancer, 2010. **103**(4): p. 505-9.
479. Greten, T.F. and T. Eggert, *Cellular senescence associated immune responses in liver cancer*. Hepat Oncol, 2017. **4**(4): p. 123-127.
480. Davalos, A.R., et al., *Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 273-83.
481. Demaria, M., et al., *Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse*. Cancer Discov, 2017. **7**(2): p. 165-176.
482. Freund, A., et al., *Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences*. Trends Mol Med, 2010. **16**(5): p. 238-46.
483. De Blander, H., et al., *Cellular Plasticity: A Route to Senescence Exit and Tumorigenesis*. Cancers (Basel), 2021. **13**(18).
484. Igelmann, S., et al., *A hydride transfer complex reprograms NAD metabolism and bypasses senescence*. Mol Cell, 2021. **81**(18): p. 3848-3865 e19.
485. Galanos, P., et al., *Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(7): p. 777-89.
486. Patel, P.L., et al., *Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(34): p. E5024-33.
487. Saleh, T., L. Tyutyunyk-Massey, and D.A. Gewirtz, *Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy*. Cancer Res, 2019. **79**(6): p. 1044-1046.

488. Martinez-Zamudio, R.I., et al., *AP-1 imprints a reversible transcriptional programme of senescent cells*. Nat Cell Biol, 2020. **22**(7): p. 842-855.
489. Duy, C., et al., *Chemotherapy Induces Senescence-Like Resilient Cells Capable of Initiating AML Recurrence*. Cancer Discov, 2021. **11**(6): p. 1542-1561.
490. Ruscetti, M., et al., *Senescence-Induced Vascular Remodeling Creates Therapeutic Vulnerabilities in Pancreas Cancer*. Cell, 2020. **181**(2): p. 424-441 e21.
491. Brenner, E., et al., *Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1335.
492. de Magalhaes, J.P., J. Costa, and O. Toussaint, *HAGR: the Human Ageing Genomic Resources*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Database issue): p. D537-43.
493. Jochems, F., et al., *The Cancer SENESCopedia: A delineation of cancer cell senescence*. Cell Rep, 2021. **36**(4): p. 109441.
494. Zhou, L., et al., *Senescence as a dictator of patient outcomes and therapeutic efficacies in human gastric cancer*. Cell Death Discov, 2022. **8**(1): p. 13.
495. Xu, M., et al., *Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age*. Nat Med, 2018. **24**(8): p. 1246-1256.
496. Childs, B.G., et al., *Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?* EMBO Rep, 2014. **15**(11): p. 1139-53.
497. Soto-Gamez, A., W.J. Quax, and M. Demaria, *Regulation of Survival Networks in Senescent Cells: From Mechanisms to Interventions*. J Mol Biol, 2019. **431**(15): p. 2629-2643.
498. Chen, J., *The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(3): p. a026104.
499. Wang, F., et al., *Biochemical and structural characterization of an intramolecular interaction in FOXO3a and its binding with p53*. J Mol Biol, 2008. **384**(3): p. 590-603.
500. Baar, M.P., et al., *Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging*. Cell, 2017. **169**(1): p. 132-147 e16.

501. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
502. Yamakoshi, K., et al., *Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53*. J Cell Biol, 2009. **186**(3): p. 393-407.
503. Nassour, J., et al., *Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10399.
504. Baker, D.J., et al., *Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan*. Nature, 2016. **530**(7589): p. 184-9.
505. Baker, D.J., et al., *Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders*. Nature, 2011. **479**(7372): p. 232-6.
506. Farr, J.N., et al., *Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice*. Nat Med, 2017. **23**(9): p. 1072-1079.
507. Jeon, O.H., et al., *Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment*. Nat Med, 2017. **23**(6): p. 775-781.
508. Zhu, Y., et al., *Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors*. Aging Cell, 2016. **15**(3): p. 428-35.
509. Zhu, Y., et al., *The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs*. Aging Cell, 2015. **14**(4): p. 644-58.
510. Diepstraten, S.T., et al., *The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs*. Nat Rev Cancer, 2022. **22**(1): p. 45-64.
511. Singh, R., A. Letai, and K. Sarosiek, *Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(3): p. 175-193.
512. Childs, B.G., et al., *Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis*. Science, 2016. **354**(6311): p. 472-477.
513. Chang, J., et al., *Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice*. Nat Med, 2016. **22**(1): p. 78-83.

514. Bussian, T.J., et al., *Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline*. *Nature*, 2018. **562**(7728): p. 578-582.
515. Kim, H.N., et al., *DNA damage and senescence in osteoprogenitors expressing *Osx1* may cause their decrease with age*. *Aging Cell*, 2017. **16**(4): p. 693-703.
516. Pan, J., et al., *Inhibition of *Bcl-2/xl* With *ABT-263* Selectively Kills Senescent Type II Pneumocytes and Reverses Persistent Pulmonary Fibrosis Induced by Ionizing Radiation in Mice*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2017. **99**(2): p. 353-361.
517. Shahbandi, A., et al., *BH3 mimetics selectively eliminate chemotherapy-induced senescent cells and improve response in *TP53* wild-type breast cancer*. *Cell Death Differ*, 2020. **27**(11): p. 3097-3116.
518. Yosef, R., et al., *Directed elimination of senescent cells by inhibition of *BCL-W* and *BCL-XL**. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11190.
519. Cang, S., et al., *ABT-199 (venetoclax) and *BCL-2* inhibitors in clinical development*. *J Hematol Oncol*, 2015. **8**: p. 129.
520. Deeks, E.D., *Venetoclax: First Global Approval*. *Drugs*, 2016. **76**(9): p. 979-87.
521. Juarez-Salcedo, L.M., V. Desai, and S. Dalia, *Venetoclax: evidence to date and clinical potential*. *Drugs Context*, 2019. **8**: p. 212574.
522. Roberts, A.W., et al., *Targeting *BCL2* with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(4): p. 311-22.
523. Roberts, A.W. and D. Huang, *Targeting *BCL2* With *BH3* Mimetics: Basic Science and Clinical Application of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia and Related B Cell Malignancies*. *Clin Pharmacol Ther*, 2017. **101**(1): p. 89-98.
524. Konopleva, M., et al., *Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the *BH3* mimetic *ABT-737* in acute myeloid leukemia*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(5): p. 375-88.
525. van Delft, M.F., et al., *The *BH3* mimetic *ABT-737* targets selective *Bcl-2* proteins and efficiently induces apoptosis via *Bak/Bax* if *Mcl-1* is neutralized*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(5): p. 389-99.

526. Rudin, C.M., et al., *Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(11): p. 3163-9.
527. Carpenter, V.J., T. Saleh, and D.A. Gewirtz, *Senolytics for Cancer Therapy: Is All That Glitters Really Gold?* Cancers (Basel), 2021. **13**(4).
528. Calcinotto, A., et al., *Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury*. Physiol Rev, 2019. **99**(2): p. 1047-1078.
529. Xue Hao, B.Z., Wei Zhou, Heng Liu, Takeshi Fukumoto, Dmitry Gabrilovich, Rugang Zhang, *Sensitization of ovarian tumor to immune checkpoint blockade by boosting senescence-associated secretory phenotype*. iScience, 2021. **24**.
530. Prasanna, P.G., et al., *Therapy-Induced Senescence: Opportunities to Improve Anticancer Therapy*. J Natl Cancer Inst, 2021. **113**(10): p. 1285-1298.
531. Toso, A., et al., *Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity*. Cell Rep, 2014. **9**(1): p. 75-89.
532. Gandhi, L., et al., *Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors*. J Clin Oncol, 2011. **29**(7): p. 909-16.
533. Sharma, A.K., et al., *The Senolytic Drug Navitoclax (ABT-263) Causes Trabecular Bone Loss and Impaired Osteoprogenitor Function in Aged Mice*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 354.
534. Kipps, T.J., et al., *A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2015. **56**(10): p. 2826-33.
535. Roberts, A.W., et al., *Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease*. J Clin Oncol, 2012. **30**(5): p. 488-96.

536. Gonzalez-Gualda, E., et al., *Galacto-conjugation of Navitoclax as an efficient strategy to increase senolytic specificity and reduce platelet toxicity*. *Aging Cell*, 2020. **19**(4): p. e13142.
537. He, Y., et al., *Using proteolysis-targeting chimera technology to reduce navitoclax platelet toxicity and improve its senolytic activity*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 1996.
538. Khan, S., et al., *A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity*. *Nat Med*, 2019. **25**(12): p. 1938-1947.
539. Zhu, Y., et al., *New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463*. *Aging (Albany NY)*, 2017. **9**(3): p. 955-963.
540. Roos, C.M., et al., *Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice*. *Aging Cell*, 2016. **15**(5): p. 973-7.
541. Schafer, M.J., et al., *Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 14532.
542. Lehmann, M., et al., *Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo*. *Eur Respir J*, 2017. **50**(2).
543. Hickson, L.J., et al., *Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease*. *EBioMedicine*, 2019. **47**: p. 446-456.
544. Yousefzadeh, M.J., et al., *Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan*. *EBioMedicine*, 2018. **36**: p. 18-28.
545. Wang, Y., et al., *Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents*. *Aging (Albany NY)*, 2016. **8**(11): p. 2915-2926.
546. Samaraweera, L., et al., *A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 1900.
547. Guerrero, A., et al., *Cardiac glycosides are broad-spectrum senolytics*. *Nat Metab*, 2019. **1**(11): p. 1074-1088.
548. Triana-Martinez, F., et al., *Identification and characterization of Cardiac Glycosides as senolytic compounds*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 4731.

549. Kang, H.T., et al., *Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence*. Nat Chem Biol, 2017. **13**(6): p. 616-623.
550. Niedernhofer, L.J. and P.D. Robbins, *Senotherapeutics for healthy ageing*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(5): p. 377.
551. Dorr, J.R., et al., *Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 421-5.
552. Yao, G.D., et al., *Blocking the utilization of glucose induces the switch from senescence to apoptosis in pseudolaric acid B-treated human lung cancer cells in vitro*. Acta Pharmacol Sin, 2017. **38**(10): p. 1401-1411.
553. Colacurcio, D.J. and R.A. Nixon, *Disorders of lysosomal acidification-The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease*. Ageing Res Rev, 2016. **32**: p. 75-88.
554. Fuhrmann-Stroissnigg, H., et al., *Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 422.
555. Trepel, J., et al., *Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(8): p. 537-49.
556. Simcox, J. and D.W. Lamming, *The central mTOR of metabolism*. Dev Cell, 2022.
557. Zhan, J.K., et al., *AMPK/TSC2/mTOR pathway regulates replicative senescence of human vascular smooth muscle cells*. Exp Ther Med, 2018. **16**(6): p. 4853-4858.
558. Kang, S.A., et al., *mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin*. Science, 2013. **341**(6144): p. 1236566.
559. Carroll, B., et al., *Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing*. J Cell Biol, 2017. **216**(7): p. 1949-1957.
560. Laberge, R.M., et al., *MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(8): p. 1049-61.
561. Wang, R., B. Sunchu, and V.I. Perez, *Rapamycin and the inhibition of the secretory phenotype*. Exp Gerontol, 2017. **94**: p. 89-92.

562. Lamming, D.W., et al., *Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 980-9.
563. Leontieva, O.V., Z.N. Demidenko, and M.V. Blagosklonny, *Dual mTORC1/C2 inhibitors suppress cellular geroconversion (a senescence program)*. Oncotarget, 2015. **6**(27): p. 23238-48.
564. Imrali, A., et al., *Rapamycin inhibits prostate cancer cell growth through cyclin D1 and enhances the cytotoxic efficacy of cisplatin*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(8): p. 1772-84.
565. Alimbetov, D., et al., *Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2*. Biogerontology, 2016. **17**(2): p. 305-15.
566. Drakos, E., et al., *Activation of the p53 pathway by the MDM2 inhibitor nutlin-3a overcomes BCL2 overexpression in a preclinical model of diffuse large B-cell lymphoma associated with t(14;18)(q32;q21)*. Leukemia, 2011. **25**(5): p. 856-67.
567. Wiley, C.D., et al., *Small-molecule MDM2 antagonists attenuate the senescence-associated secretory phenotype*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 2410.
568. Pitozzi, V., et al., *Chronic resveratrol treatment ameliorates cell adhesion and mitigates the inflammatory phenotype in senescent human fibroblasts*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013. **68**(4): p. 371-81.
569. Lim, H., H. Park, and H.P. Kim, *Effects of flavonoids on senescence-associated secretory phenotype formation from bleomycin-induced senescence in BJ fibroblasts*. Biochem Pharmacol, 2015. **96**(4): p. 337-48.
570. Perrott, K.M., et al., *Apigenin suppresses the senescence-associated secretory phenotype and paracrine effects on breast cancer cells*. Geroscience, 2017. **39**(2): p. 161-173.
571. Moiseeva, O., et al., *Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation*. Aging Cell, 2013. **12**(3): p. 489-98.
572. Hu, Q., et al., *Metformin as a senostatic drug enhances the anticancer efficacy of CDK4/6 inhibitor in head and neck squamous cell carcinoma*. Cell Death Dis, 2020. **11**(10): p. 925.

573. Sinnott-Smith, J., et al., *Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: dependence on glucose concentration and role of AMPK*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **430**(1): p. 352-7.
574. Laberge, R.M., et al., *Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype*. *Aging Cell*, 2012. **11**(4): p. 569-78.
575. Paez-Ribes, M., et al., *Targeting senescent cells in translational medicine*. *EMBO Mol Med*, 2019. **11**(12): p. e10234.
576. Valanne, S., J.H. Wang, and M. Ramet, *The Drosophila Toll signaling pathway*. *J Immunol*, 2011. **186**(2): p. 649-56.
577. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
578. Cai, X., Y.H. Chiu, and Z.J. Chen, *The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling*. *Mol Cell*, 2014. **54**(2): p. 289-96.
579. Moresco, E.M., D. LaVine, and B. Beutler, *Toll-like receptors*. *Curr Biol*, 2011. **21**(13): p. R488-93.
580. Lee, S.M., et al., *Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(10): p. 3793-8.
581. De Nardo, D., *Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation*. *Cytokine*, 2015. **74**(2): p. 181-9.
582. Leifer, C.A. and A.E. Medvedev, *Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling*. *J Leukoc Biol*, 2016. **100**(5): p. 927-941.
583. Qian, C. and X. Cao, *Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses*. *Ann N Y Acad Sci*, 2013. **1283**: p. 67-74.
584. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(5): p. 373-84.
585. Blasius, A.L. and B. Beutler, *Intracellular toll-like receptors*. *Immunity*, 2010. **32**(3): p. 305-15.

586. Hirotani, T., et al., *Regulation of lipopolysaccharide-inducible genes by MyD88 and Toll/IL-1 domain containing adaptor inducing IFN-beta*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **328**(2): p. 383-92.
587. O'Neill, L.A., D. Golenbock, and A.G. Bowie, *The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(6): p. 453-60.
588. Kawasaki, T. and T. Kawai, *Toll-like receptor signaling pathways*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 461.
589. Jiang, Z., et al., *Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 16713-9.
590. Jiang, Z., et al., *Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(10): p. 3533-8.
591. Price, A.E., et al., *A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns*. *Immunity*, 2018. **49**(3): p. 560-575.e6.
592. Khakpour, S., K. Wilhelmsen, and J. Hellman, *Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis*. *Innate Immun*, 2015. **21**(8): p. 827-46.
593. Poulain-Godefroy, O., et al., *Inflammatory role of Toll-like receptors in human and murine adipose tissue*. *Mediators Inflamm*, 2010. **2010**: p. 823486.
594. Dasari, P., et al., *Expression of toll-like receptors on B lymphocytes*. *Cell Immunol*, 2005. **236**(1-2): p. 140-5.
595. Reynolds, J.M. and C. Dong, *Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(10): p. 511-9.
596. Li, J., et al., *The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment*. *Oncotarget*, 2017. **8**(39): p. 66656-66667.

597. Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors and cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 57-63.
598. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Control of B-cell responses by Toll-like receptors*. Nature, 2005. **438**(7066): p. 364-8.
599. Rawlings, D.J., et al., *Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 282-94.
600. Caramalho, I., et al., *Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 403-11.
601. Conroy, H., N.A. Marshall, and K.H. Mills, *TLR ligand suppression or enhancement of Treg cells? A double-edged sword in immunity to tumours*. Oncogene, 2008. **27**(2): p. 168-80.
602. Jin, B., et al., *The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 836485.
603. Chiba, S., et al., *Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1*. Nat Immunol, 2012. **13**(9): p. 832-42.
604. Oblak, A. and R. Jerala, *Toll-like receptor 4 activation in cancer progression and therapy*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 609579.
605. Vaure, C. and Y. Liu, *A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 316.
606. Zanoni, I., et al., *CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4*. Cell, 2011. **147**(4): p. 868-80.
607. Ullah, M.O., et al., *TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(1): p. 27-45.
608. Hacker, H., et al., *Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 204-7.

609. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
610. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-151.
611. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
612. Qureshi, S.T., et al., *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 615-25.
613. Flo, T.H., et al., *Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35489-95.
614. Yang, S., et al., *Micrococcus luteus teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2025-30.
615. Haynes, L.M., et al., *Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 10730-7.
616. Kurt-Jones, E.A., et al., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 398-401.
617. Fang, H., et al., *Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30393-30400.
618. Sims, G.P., et al., *HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 367-88.
619. Holzinger, D., K. Tenbrock, and J. Roth, *Alarmins of the S100-Family in Juvenile Autoimmune and Auto-Inflammatory Diseases*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 182.
620. Zuniga, M.C., et al., *PKC-epsilon and TLR4 synergistically regulate resistin-mediated inflammation in human macrophages*. Atherosclerosis, 2017. **259**: p. 51-59.
621. Choi, S.H., et al., *Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake*. Circ Res, 2009. **104**(12): p. 1355-63.

622. Huang, S., et al., *Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways*. J Lipid Res, 2012. **53**(9): p. 2002-13.
623. Caesar, R., et al., *Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling*. Cell Metab, 2015. **22**(4): p. 658-68.
624. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16683-9.
625. Nguyen, M.T., et al., *A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 35279-92.
626. Fan, C.S., et al., *Extracellular HSP90alpha Induces MyD88-IRAK Complex-Associated IKKalpha/beta-NF-kappaB/IRF3 and JAK2/TYK2-STAT-3 Signaling in Macrophages for Tumor-Promoting M2-Polarization*. Cells, 2022. **11**(2).
627. Hotamisligil, G.S., *Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders*. Nature, 2017. **542**(7640): p. 177-185.
628. Liao, F., et al., *Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2572-9.
629. Locke, A.E., et al., *Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology*. Nature, 2015. **518**(7538): p. 197-206.
630. Ahmad, S., et al., *Established BMI-associated genetic variants and their prospective associations with BMI and other cardiometabolic traits: the GLACIER Study*. Int J Obes (Lond), 2016. **40**(9): p. 1346-52.
631. Weyrich, P., et al., *The D299G/T399I Toll-like receptor 4 variant associates with body and liver fat: results from the TULIP and METSIM Studies*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13980.
632. Ferwerda, B., et al., *TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(42): p. 16645-50.

633. Schroder, N.W. and R.R. Schumann, *Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(3): p. 156-64.
634. Medvedev, A.E., *Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer*. J Interferon Cytokine Res, 2013. **33**(9): p. 467-84.
635. Mukherjee, S. and A. Tripathi, *Contribution of Toll like receptor polymorphisms to dengue susceptibility and clinical outcome among eastern Indian patients*. Immunobiology, 2019. **224**(6): p. 774-785.
636. Richard, K., et al., *A mouse model of human TLR4 D299G/T399I SNPs reveals mechanisms of altered LPS and pathogen responses*. J Exp Med, 2021. **218**(2).
637. Milanski, M., et al., *Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity*. J Neurosci, 2009. **29**(2): p. 359-70.
638. Saberi, M., et al., *Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice*. Cell Metab, 2009. **10**(5): p. 419-29.
639. Tsukumo, D.M., et al., *Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 1986-98.
640. Vijay-Kumar, M., et al., *Loss of function mutation in toll-like receptor-4 does not offer protection against obesity and insulin resistance induced by a diet high in trans fat in mice*. J Inflamm (Lond), 2011. **8**(1): p. 2.
641. Zhou, Z.Y., et al., *Chronic low-grade inflammation is involved in TLR4 knockout-induced spontaneous obesity in aged mice*. Biomed Pharmacother, 2022. **147**: p. 112637.
642. Schenk, S., M. Saberi, and J.M. Olefsky, *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 2992-3002.
643. Baffy, G., *Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view*. J Hepatol, 2009. **51**(1): p. 212-23.
644. Jia, L., et al., *Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3878.

645. Griffin, C., et al., *TLR4, TRIF, and MyD88 are essential for myelopoiesis and CD11c(+) adipose tissue macrophage production in obese mice*. J Biol Chem, 2018. **293**(23): p. 8775-8786.
646. Orr, J.S., et al., *Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2718-27.
647. Vila, I.K., et al., *Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis*. Cell Rep, 2014. **7**(4): p. 1116-29.
648. Ghanim, H., et al., *Acute modulation of toll-like receptors by insulin*. Diabetes Care, 2008. **31**(9): p. 1827-31.
649. Haehnel, V., et al., *Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5629-37.
650. Rehli, M., et al., *PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9773-81.
651. Reyna, S.M., et al., *Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects*. Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2595-602.
652. Vitseva, O.I., et al., *Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(5): p. 932-7.
653. Fresno, M., R. Alvarez, and N. Cuesta, *Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity*. Arch Physiol Biochem, 2011. **117**(3): p. 151-64.
654. Ahmad, R., et al., *Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation*. J Inflamm (Lond), 2012. **9**(1): p. 48.
655. Dasu, M.R., et al., *Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects*. Diabetes Care, 2010. **33**(4): p. 861-8.
656. Konner, A.C. and J.C. Bruning, *Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(1): p. 16-23.

657. Aljada, A., et al., *Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect.* Am J Clin Nutr, 2004. **79**(4): p. 682-90.
658. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.* J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
659. Pal, D., et al., *Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance.* Nat Med, 2012. **18**(8): p. 1279-85.
660. Denecke, B., et al., *Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A.* Biochem J, 2003. **376**(Pt 1): p. 135-45.
661. Kalabay, L., et al., *Human recombinant alpha 2-HS glycoprotein is produced in insect cells as a full length inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase.* Horm Metab Res, 1998. **30**(1): p. 1-6.
662. Lee, J.Y., et al., *Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids.* J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37041-51.
663. Schaeffler, A., et al., *Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity.* Immunology, 2009. **126**(2): p. 233-45.
664. Hwang, D.H., J.A. Kim, and J.Y. Lee, *Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid.* Eur J Pharmacol, 2016. **785**: p. 24-35.
665. Kim, F., et al., *Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity.* Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1589-96.
666. Capurso, C. and A. Capurso, *From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids.* Vascul Pharmacol, 2012. **57**(2-4): p. 91-7.
667. Lancaster, G.I., et al., *Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism.* Cell Metab, 2018. **27**(5): p. 1096-1110.e5.

668. Yoshida, H., et al., *XBPI mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. Cell, 2001. **107**(7): p. 881-91.
669. Tzeng, H.T., I.T. Chyuan, and W.Y. Chen, *Shaping of Innate Immune Response by Fatty Acid Metabolite Palmitate*. Cells, 2019. **8**(12).
670. Ix, J.H., et al., *Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study*. Circulation, 2006. **113**(14): p. 1760-7.
671. Brix, J.M., et al., *Elevated Fetuin-A concentrations in morbid obesity decrease after dramatic weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(11): p. 4877-81.
672. Ishibashi, A., et al., *Serum fetuin-A is an independent marker of insulin resistance in Japanese men*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(9): p. 925-33.
673. Ix, J.H., et al., *Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons*. JAMA, 2008. **300**(2): p. 182-8.
674. Reinehr, T. and C.L. Roth, *Fetuin-A and its relation to metabolic syndrome and fatty liver disease in obese children before and after weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11): p. 4479-85.
675. Stefan, N., et al., *Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans*. Diabetes Care, 2006. **29**(4): p. 853-7.
676. Liu, S., et al., *Serum Fetuin-A levels are increased and associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome*. BMC Endocr Disord, 2020. **20**(1): p. 67.
677. van Oostrom, A.J., et al., *Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers*. Atherosclerosis, 2004. **177**(1): p. 175-82.
678. Erridge, C., et al., *A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(5): p. 1286-92.
679. Devaraj, S., et al., *Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(2): p. 578-83.

680. Sampath, H. and J.M. Ntambi, *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression*. Nutr Rev, 2004. **62**(9): p. 333-9.
681. Stryjecki, C. and D.M. Mutch, *Fatty acid-gene interactions, adipokines and obesity*. Eur J Clin Nutr, 2011. **65**(3): p. 285-97.
682. Lee, J.Y., et al., *Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids*. J Lipid Res, 2003. **44**(3): p. 479-86.
683. Endres, S., et al., *Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation*. J Leukoc Biol, 1993. **54**(6): p. 599-603.
684. Moser, V.A., M.F. Uchoa, and C.J. Pike, *TLR4 inhibitor TAK-242 attenuates the adverse neural effects of diet-induced obesity*. J Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 306.
685. Dhanapal, R., T. Saraswathi, and R.N. Govind, *Cancer cachexia*. J Oral Maxillofac Pathol, 2011. **15**(3): p. 257-60.
686. Henriques, F., et al., *Toll-Like Receptor-4 Disruption Suppresses Adipose Tissue Remodeling and Increases Survival in Cancer Cachexia Syndrome*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 18024.
687. Aref, S., et al., *Clinical Implication of Toll-Like Receptors (TLR2 and TLR4) Polymorphisms in Adult Patients with Acute B-cell Lymphoblastic Leukemia*. Asian Pac J Cancer Prev, 2022. **23**(3): p. 823-828.
688. Xiong, Y., et al., *R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88*. J Biol Chem, 2012. **287**(45): p. 38327-37.
689. Syrjala, H., et al., *Blood stream infections during chemotherapy-induced neutropenia in adult patients with acute myeloid leukemia: treatment cycle matters*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(10): p. 1211-8.
690. Hold, G.L., et al., *A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors*. Gastroenterology, 2007. **132**(3): p. 905-12.
691. Shi, Y.J., et al., *Toll-like receptor 4 regulates spontaneous intestinal tumorigenesis by up-regulating IL-6 and GM-CSF*. J Cell Mol Med, 2020. **24**(1): p. 385-397.

692. Huang, B.Z., et al., *Polymorphisms in genes related to inflammation and obesity and colorectal adenoma risk*. Mol Carcinog, 2018. **57**(10): p. 1278-1288.
693. Pandey, N.O., et al., *Association of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes with cervical cancer susceptibility*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 9729.
694. Neamatallah, M., et al., *Impact of Toll-like Receptors 2(TLR2) and TLR 4 Gene Variations on HCV Susceptibility, Response to Treatment and Development of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic HCV Patients*. Immunol Invest, 2020. **49**(4): p. 462-476.
695. Zhao, D., et al., *Single-nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor genes are associated with the prognosis of gastric cancer and are not associated with Helicobacter pylori infection*. Infect Genet Evol, 2019. **73**: p. 384-389.
696. Huang, L., et al., *Polymorphisms of the TLR4 gene and risk of gastric cancer*. Gene, 2014. **537**(1): p. 46-50.
697. Li, Z., et al., *Genetic variants in the regulation region of TLR4 reduce the gastric cancer susceptibility*. Gene, 2021. **767**: p. 145181.
698. Allott, E.H. and S.D. Hursting, *Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies*. Endocr Relat Cancer, 2015. **22**(6): p. R365-86.
699. Blando, J., et al., *Dietary energy balance modulates prostate cancer progression in Hi-Myc mice*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(12): p. 2002-14.
700. Kobayashi, N., et al., *Effect of low-fat diet on development of prostate cancer and Akt phosphorylation in the Hi-Myc transgenic mouse model*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 3066-73.
701. Labbe, D.P., et al., *Role of diet in prostate cancer: the epigenetic link*. Oncogene, 2015. **34**(36): p. 4683-91.
702. Liu, J., et al., *High-calorie diet exacerbates prostate neoplasia in mice with haploinsufficiency of Pten tumor suppressor gene*. Mol Metab, 2015. **4**(3): p. 186-98.
703. Labbe, D.P., et al., *High-fat diet fuels prostate cancer progression by rewiring the metabolome and amplifying the MYC program*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4358.

704. Pascual, G., et al., *Dietary palmitic acid promotes a prometastatic memory via Schwann cells*. Nature, 2021. **599**(7885): p. 485-490.
705. Hu, X., et al., *Toll-like receptor 4 is a master regulator for colorectal cancer growth under high-fat diet by programming cancer metabolism*. Cell Death Dis, 2021. **12**(8): p. 791.
706. Li, X.M., et al., *A novel inflammatory regulator TIPE2 inhibits TLR4-mediated development of colon cancer via caspase-8*. Cancer Biomark, 2014. **14**(4): p. 233-40.
707. Yan, S., et al., *MicroRNA-6869-5p acts as a tumor suppressor via targeting TLR4/NF-kappaB signaling pathway in colorectal cancer*. J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6660-6668.
708. Andreani, V., et al., *Activation of Toll-like receptor 4 on tumor cells in vitro inhibits subsequent tumor growth in vivo*. Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10519-27.
709. Sangwan, V., et al., *Inhibition of LPS-mediated TLR4 activation abrogates gastric adenocarcinoma-associated peritoneal metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2022. **39**(2): p. 323-333.
710. Yoshimoto, S., et al., *Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome*. Nature, 2013. **499**(7456): p. 97-101.
711. Muccioli, M. and F. Benencia, *Toll-like Receptors in Ovarian Cancer as Targets for Immunotherapies*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 341.
712. Kelly, M.G., et al., *TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3859-68.
713. Fleming, V., et al., *Melanoma Extracellular Vesicles Generate Immunosuppressive Myeloid Cells by Upregulating PD-L1 via TLR4 Signaling*. Cancer Res, 2019. **79**(18): p. 4715-4728.
714. Lu, Y., et al., *TLR4 plays a crucial role in MSC-induced inhibition of NK cell function*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **464**(2): p. 541-7.
715. Tachibana, M., *[The Immunosuppressive Function of Myeloid-derived Suppressor Cells Is Regulated by the HMGB1-TLR4 Axis]*. Yakugaku Zasshi, 2018. **138**(2): p. 143-148.
716. Zhang, J., et al., *HMGB1, an innate alarmin, plays a critical role in chronic inflammation of adipose tissue in obesity*. Mol Cell Endocrinol, 2017. **454**: p. 103-111.

717. Lotze, M.T. and K.J. Tracey, *High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 331-42.
718. Chen, T., et al., *Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1449-59.
719. Bhowmick, N.A., et al., *TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia*. Science, 2004. **303**(5659): p. 848-51.
720. Ehrchen, J.M., et al., *The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 557-66.
721. Basu, S., et al., *Helicobacter pylori protein HP0175 transactivates epidermal growth factor receptor through TLR4 in gastric epithelial cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32369-76.
722. Chattopadhyay, S. and G.C. Sen, *Tyrosine phosphorylation in Toll-like receptor signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(5): p. 533-41.
723. Chattopadhyay, S., et al., *EGFR kinase activity is required for TLR4 signaling and the septic shock response*. EMBO Rep, 2015. **16**(11): p. 1535-47.
724. De, S., et al., *Erlotinib protects against LPS-induced endotoxicity because TLR4 needs EGFR to signal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(31): p. 9680-5.
725. Medvedev, A.E., et al., *Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16042-53.
726. Okamoto, I., *Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR-targeted anticancer therapy*. FEBS J, 2010. **277**(2): p. 309-15.
727. Thuringer, D., et al., *Transactivation of the epidermal growth factor receptor by heat shock protein 90 via Toll-like receptor 4 contributes to the migration of glioblastoma cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3418-28.

728. Han, S., et al., *Crosstalk between the HIF-1 and Toll-like receptor/nuclear factor-kappaB pathways in the oral squamous cell carcinoma microenvironment*. *Oncotarget*, 2016. **7**(25): p. 37773-37789.
729. Moench, R., et al., *Exclusive inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling is not sufficient to prevent PDGF-mediated effects on glycolysis and proliferation in colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(42): p. 68749-68767.
730. Zandi, Z., et al., *TLR4 blockade using TAK-242 suppresses ovarian and breast cancer cells invasion through the inhibition of extracellular matrix degradation and epithelial-mesenchymal transition*. *Eur J Pharmacol*, 2019. **853**: p. 256-263.
731. Zhang, X., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates the toll-like receptor 4 signaling pathway leading to anti-tumor effects in human hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions*. *Oncol Lett*, 2016. **12**(2): p. 1034-1040.
732. Khan, K.N., et al., *Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriosis by human heat-shock protein 70*. *Hum Reprod*, 2008. **23**(10): p. 2210-9.
733. Li, N., et al., *LPS-induced CXCR7 expression promotes gastric Cancer proliferation and migration via the TLR4/MD-2 pathway*. *Diagn Pathol*, 2019. **14**(1): p. 3.
734. Xu, H., et al., *Alteration of CXCR7 expression mediated by TLR4 promotes tumor cell proliferation and migration in human colorectal carcinoma*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e27399.
735. Wang, Y., et al., *CXC195 suppresses proliferation and inflammatory response in LPS-induced human hepatocellular carcinoma cells via regulating TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF-kappaB and MAPK pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **456**(1): p. 373-9.
736. Zhu, C., et al., *Plasminogen Activator Inhibitor 1 Promotes Immunosuppression in Human Non-Small Cell Lung Cancers by Enhancing TGF-Beta1 Expression in Macrophage*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **44**(6): p. 2201-2211.
737. Davalos, A.R., et al., *p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes*. *J Cell Biol*, 2013. **201**(4): p. 613-29.

738. Sokolova, M., et al., *Palmitate promotes inflammatory responses and cellular senescence in cardiac fibroblasts*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017. **1862**(2): p. 234-245.
739. Aquino-Martinez, R., et al., *LPS-induced premature osteocyte senescence: Implications in inflammatory alveolar bone loss and periodontal disease pathogenesis*. *Bone*, 2020. **132**: p. 115220.
740. Wang, Y., et al., *Metformin attenuates lipopolysaccharide-induced epithelial cell senescence by activating autophagy*. *Cell Biol Int*, 2021. **45**(5): p. 927-935.
741. Yu, H.M., et al., *Repeated lipopolysaccharide stimulation induces cellular senescence in BV2 cells*. *Neuroimmunomodulation*, 2012. **19**(2): p. 131-6.
742. Wang, Z., et al., *Repairing DNA damage by XRCC6/KU70 reverses TLR4-deficiency-worsened HCC development via restoring senescence and autophagic flux*. *Autophagy*, 2013. **9**(6): p. 925-7.
743. Seo, S.W., et al., *TLR4-mediated activation of the ERK pathway following UVA irradiation contributes to increased cytokine and MMP expression in senescent human dermal fibroblasts*. *PLoS One*, 2018. **13**(8): p. e0202323.
744. Feng, G., et al., *Repeated stimulation by LPS promotes the senescence of DPSCs via TLR4/MyD88-NF- κ B-p53/p21 signaling*. *Cytotechnology*, 2018. **70**(3): p. 1023-1035.
745. Fernandez-Duran, I., et al., *Cytoplasmic innate immune sensing by the caspase-4 non-canonical inflammasome promotes cellular senescence*. *Cell Death Differ*, 2021.
746. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(12): p. 1798-806.
747. Lauby-Secretan, B., et al., *Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(8): p. 794-8.
748. Romagosa, C., et al., *p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors*. *Oncogene*, 2011. **30**(18): p. 2087-97.

749. Witkiewicz, A.K., et al., *The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments*. Cell Cycle, 2011. **10**(15): p. 2497-503.
750. Yu, L., et al., *Complete loss of miR-200 family induces EMT associated cellular senescence in gastric cancer*. Oncogene, 2021.
751. Baldominos, P., et al., *Quiescent cancer cells resist T cell attack by forming an immunosuppressive niche*. Cell, 2022. **185**: p. 1–15.
752. He, W., et al., *TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance*. Mol Immunol, 2007. **44**(11): p. 2850-9.
753. Pei, Z., et al., *TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGFbeta1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide*. Cell Immunol, 2008. **254**(1): p. 20-7.
754. Ran, S., *The Role of TLR4 in Chemotherapy-Driven Metastasis*. Cancer Res, 2015. **75**(12): p. 2405-10.
755. Huang, B., et al., *Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5009-14.
756. Sokolova, M., et al., *Palmitate promotes inflammatory responses and cellular senescence in cardiac fibroblasts*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017. **1862**(2): p. 234-245.
757. Rutkowski, D.T. and R.S. Hegde, *Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response*. J Cell Biol, 2010. **189**(5): p. 783-94.
758. Fonseca, S.G., J. Gromada, and F. Urano, *Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(7): p. 266-74.
759. Carrasco, D.R., et al., *The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis*. Cancer Cell, 2007. **11**(4): p. 349-60.
760. Papandreou, I., et al., *Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1311-4.

761. Li, A., et al., *The Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Balancing Immunity and Tolerance in Health and Diseases: Mechanisms and Opportunities*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 3154.
762. Balsa, E., et al., *ER and Nutrient Stress Promote Assembly of Respiratory Chain Supercomplexes through the PERK-eIF2alpha Axis*. Mol Cell, 2019. **74**(5): p. 877-890 e6.
763. Maamoun, H., et al., *Crosstalk Between Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Endothelial Dysfunction and Aberrant Angiogenesis Associated With Diabetes: A Focus on the Protective Roles of Heme Oxygenase (HO)-1*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 70.
764. Ren, H., et al., *The Cross-Links of Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Neurodegeneration in Parkinson's Disease*. Front Aging Neurosci, 2021. **13**: p. 691881.
765. Binet, F., et al., *Neuronal ER stress impedes myeloid-cell-induced vascular regeneration through IRE1alpha degradation of netrin-1*. Cell Metab, 2013. **17**(3): p. 353-71.
766. Wang, M. and R.J. Kaufman, *Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease*. Nature, 2016. **529**(7586): p. 326-35.
767. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
768. Zhou, J., et al., *The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(39): p. 14343-8.
769. Acosta-Alvear, D., et al., *XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 53-66.
770. Reimold, A.M., et al., *An essential role in liver development for transcription factor XBP-1*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 152-7.
771. Reimold, A.M., et al., *Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 300-7.
772. Lee, A.H., et al., *XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands*. EMBO J, 2005. **24**(24): p. 4368-80.

773. Kim, S., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced IRE1alpha activation mediates cross-talk of GSK-3beta and XBP-1 to regulate inflammatory cytokine production*. J Immunol, 2015. **194**(9): p. 4498-506.
774. Shi, W., et al., *Unravel the molecular mechanism of XBP1 in regulating the biology of cancer cells*. J Cancer, 2019. **10**(9): p. 2035-2046.
775. Sun, H., et al., *Inhibition of IRE1alpha-driven pro-survival pathways is a promising therapeutic application in acute myeloid leukemia*. Oncotarget, 2016. **7**(14): p. 18736-49.
776. Lhomond, S., et al., *Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development*. EMBO Mol Med, 2018. **10**(3).
777. Storm, M., et al., *Prostate cancer and the unfolded protein response*. Oncotarget, 2016. **7**(33): p. 54051-54066.
778. Amawi, H., et al., *Bax/Tubulin/Epithelial-Mesenchymal Pathways Determine the Efficacy of Silybin Analog HM015k in Colorectal Cancer Cell Growth and Metastasis*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 520.
779. Zhao, N., et al., *Pharmacological targeting of MYC-regulated IRE1/XBP1 pathway suppresses MYC-driven breast cancer*. J Clin Invest, 2018. **128**(4): p. 1283-1299.
780. Logue, S.E., et al., *Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3267.
781. Sheng, X., et al., *IRE1alpha-XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 323.
782. Hetz, C., et al., *The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1219-43.
783. Martinon, F., et al., *TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 411-8.
784. Martinon, F. and L.H. Glimcher, *Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(1): p. 35-40.
785. Qiu, Q., et al., *Toll-like receptor-mediated IRE1alpha activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis*. EMBO J, 2013. **32**(18): p. 2477-90.

786. Pierre, N., et al., *Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e65061.
787. Shen, C., et al., *The TLR4-IRE1alpha pathway activation contributes to palmitate-elicited lipotoxicity in hepatocytes*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(7): p. 3572-3581.
788. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
789. Ozcan, U., et al., *Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1137-40.
790. Gunn, K.E., et al., *A role for the unfolded protein response in optimizing antibody secretion*. Mol Immunol, 2004. **41**(9): p. 919-27.
791. Cubillos-Ruiz, J.R., et al., *ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis*. Cell, 2015. **161**(7): p. 1527-38.
792. Yan, D., et al., *STAT3 and STAT6 Signaling Pathways Synergize to Promote Cathepsin Secretion from Macrophages via IRE1alpha Activation*. Cell Rep, 2016. **16**(11): p. 2914-2927.
793. Harnoss, J.M., et al., *IRE1alpha Disruption in Triple-Negative Breast Cancer Cooperates with Antiangiogenic Therapy by Reversing ER Stress Adaptation and Remodeling the Tumor Microenvironment*. Cancer Res, 2020. **80**(11): p. 2368-2379.
794. Imbroisi Filho, R., et al., *Western diet leads to aging-related tumorigenesis via activation of the inflammatory, UPR, and EMT pathways*. Cell Death Dis, 2021. **12**(7): p. 643.
795. Shao, M., et al., *Hepatic IRE1alpha regulates fasting-induced metabolic adaptive programs through the XBP1s-PPARalpha axis signalling*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3528.
796. Shan, B., et al., *The metabolic ER stress sensor IRE1alpha suppresses alternative activation of macrophages and impairs energy expenditure in obesity*. Nat Immunol, 2017. **18**(5): p. 519-529.
797. James, E.L., et al., *Senescent human fibroblasts show increased glycolysis and redox homeostasis with extracellular metabolomes that overlap with those of irreparable DNA damage, aging, and disease*. J Proteome Res, 2015. **14**(4): p. 1854-71.

798. Wiley, C.D. and J. Campisi, *From Ancient Pathways to Aging Cells-Connecting Metabolism and Cellular Senescence*. Cell Metab, 2016. **23**(6): p. 1013-1021.
799. Blazanin, N., et al., *ER stress and distinct outputs of the IRE1alpha RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(37): p. 9900-9905.
800. Zhu, B., et al., *The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) promotes oncogene-induced cellular senescence through repression of endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2014. **289**(29): p. 20102-19.
801. Dufey, E., et al., *Genotoxic stress triggers the activation of IRE1alpha-dependent RNA decay to modulate the DNA damage response*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 2401.
802. Denoyelle, C., et al., *Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(10): p. 1053-63.
803. Erson, A.E. and E.M. Petty, *Molecular and genetic events in neoplastic transformation*. 3rd Edition ed. Cancer Epidemiology and Prevention, ed. D.F. Schottenfeld, J. F. Jr. . Vol. 4. 2006, New York: Oxford University Press.
804. Marcoux, S., et al., *Expression of the senescence marker p16INK4a in skin biopsies of acute lymphoblastic leukemia survivors: a pilot study*. Radiat Oncol, 2013. **8**: p. 252.
805. Scherr, A.L., et al., *Bcl-xL is an oncogenic driver in colorectal cancer*. Cell Death Dis, 2016. **7**(8): p. e2342.
806. Zhu, H., et al., *Bcl-XL small interfering RNA suppresses the proliferation of 5-fluorouracil-resistant human colon cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(3): p. 451-6.
807. Dunne, P.D., et al., *Bcl-xL as a poor prognostic biomarker and predictor of response to adjuvant chemotherapy specifically in BRAF-mutant stage II and III colon cancer*. Oncotarget, 2018. **9**(17): p. 13834-13847.
808. Wacheck, V., et al., *Bcl-x(L) antisense oligonucleotides radiosensitise colon cancer cells*. Br J Cancer, 2003. **89**(7): p. 1352-7.
809. Cragg, M.S., et al., *Treatment of B-RAF mutant human tumor cells with a MEK inhibitor requires Bim and is enhanced by a BH3 mimetic*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3651-9.

810. Cragg, M.S., et al., *Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics*. PLoS Med, 2007. **4**(10): p. 1681-89; discussion 1690.
811. Gong, Y., et al., *Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas*. PLoS Med, 2007. **4**(10): p. e294.
812. Lopez, A., et al., *Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 1199.
813. Li, S., et al., *Metabolism drives macrophage heterogeneity in the tumor microenvironment*. Cell Rep, 2022. **39**(1): p. 110609.
814. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 176-85.
815. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
816. Ruffell, B., N.I. Affara, and L.M. Coussens, *Differential macrophage programming in the tumor microenvironment*. Trends Immunol, 2012. **33**(3): p. 119-26.
817. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
818. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 263-74.
819. Forssell, J., et al., *High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(5): p. 1472-9.
820. Shimura, S., et al., *Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression*. Cancer Res, 2000. **60**(20): p. 5857-61.
821. Welsh, T.J., et al., *Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(35): p. 8959-67.

822. Mogilenko, D.A., et al., *Metabolic and Innate Immune Cues Merge into a Specific Inflammatory Response via the UPR*. Cell, 2019. **178**(1): p. 263.
823. Ganeshan, K., et al., *Energetic Trade-Offs and Hypometabolic States Promote Disease Tolerance*. Cell, 2019. **177**(2): p. 399-413 e12.
824. Almendariz-Palacios, C., et al., *Still Living Better through Chemistry: An Update on Caloric Restriction and Caloric Restriction Mimetics as Tools to Promote Health and Lifespan*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(23).
825. Hoshino, S., M. Kobayashi, and Y. Higami, *Mechanisms of the anti-aging and longevity effects of caloric restriction: evidence from studies of genetically modified animals*. Aging (Albany NY), 2018. **10**(9): p. 2243-2251.
826. Del Bo, C., et al., *Overview of Human Intervention Studies Evaluating the Impact of the Mediterranean Diet on Markers of DNA Damage*. Nutrients, 2019. **11**(2).
827. Pahl, H.L. and P.A. Baeuerle, *A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B*. EMBO J, 1995. **14**(11): p. 2580-8.
828. Watowich, S.S., R.I. Morimoto, and R.A. Lamb, *Flux of the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein through the endoplasmic reticulum activates transcription of the GRP78-BiP gene*. J Virol, 1991. **65**(7): p. 3590-7.
829. Nakatani, Y., et al., *Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 847-51.
830. Ozawa, K., et al., *The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(3): p. 657-63.
831. Fafian-Labora, J.A. and A. O'Loghlen, *Classical and Nonclassical Intercellular Communication in Senescence and Ageing*. Trends Cell Biol, 2020. **30**(8): p. 628-639.
832. Borghesan, M., et al., *Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3*. Cell Rep, 2019. **27**(13): p. 3956-3971 e6.

833. Lehmann, B.D., et al., *Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(19): p. 7864-71.
834. Urbanelli, L., et al., *Extracellular Vesicles as New Players in Cellular Senescence*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(9).
835. Xu, D. and H. Tahara, *The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013. **65**(3): p. 368-75.