

Université de Montréal

**Le rôle du gène suppresseur de tumeur *p17rd* dans la
carcinogénèse et la réponse immunitaire innée**

Par

Charlotte Girondel

Programme Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor

en Pharmacologie

Mai, 2020

© Charlotte Girondel, 2020

Université de Montréal

Unité académique : Pharmacologie et physiologie//institut de recherche en Immunologie
et Cancérologie, Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

**Le rôle du gène suppresseur de tumeur *p16^{INK4}* dans la carcinogénèse et la
réponse immunitaire innée**

Présenté par

Charlotte Girondel

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

Jean-Philippe Gratton

Président-rapporteur

Sylvain Meloche

Directeur de recherche

Christian Beauséjour

Membre du jury

Nicole Beauchemin

Examineur externe

Résumé

Le récepteur D de l'interleukine-17 (IL-17RD), également connu sous le nom d'expression similaire aux gènes FGF (SEF), est un membre de la famille des récepteurs de l'IL-17 et une protéine carrefour qui régule principalement négativement les voies de signalisation mitogènes, comme la voie des MAP kinases ERK1/2 et la signalisation immunitaire innée.

Au vu du nombre grandissant d'évidences montrant que l'expression d'IL-17RD est régulée à la baisse dans une variété de tumeurs solides, nous et d'autres équipes avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait exercer des fonctions de suppression de tumeur. Cependant, le rôle d'IL-17RD dans la biologie tumorale reste à étudier *in vivo*.

Dans une première étude, en combinant l'analyse d'une cohorte longitudinale de vieillissement et d'un modèle de cancer colorectal associé à la colite, nous avons découvert qu'IL-17RD est un véritable gène suppresseur de tumeur *in vivo*. Nous avons constaté que la perturbation génétique d'*Il17rd* entraîne une augmentation de la formation de tumeurs dans les deux modèles. De manière intéressante, le développement d'une tumeur dans le modèle de cancer colorectal associé à la colite a été associé à une réponse inflammatoire exacerbée. Parce qu'il est désormais généralement admis que l'inflammation et le cancer sont liés et que nous n'avons observé aucun changement dans la prolifération et l'activation de la voie des MAP kinases ERK1/2 dans les cellules épithéliales intestinales normales ou tumorales lors de l'inactivation génétique de l'IL-17RD, nos résultats établissent l'IL-17RD comme suppresseur de tumeur qui exerce sa fonction en limitant l'étendue et la durée de l'inflammation. Nous avons en outre montré que la perte d'IL-17RD accroît les signalisations du récepteur de type Toll et de l'IL-17A dans les cellules d'adénocarcinome du côlon.

Dans une deuxième étude, nous avons évalué l'étendue du potentiel régulateur d'IL-17RD dans l'inflammation. Notre étude révèle qu'IL-17RD régule non seulement l'immunité innée médiée par le TLR et l'IL-17, mais inhibe également l'immunité innée antivirale médiée par les capteurs d'acide nucléique, à savoir la signalisation induite par

RIG-I. Ces résultats établissent IL-17RD comme un nouveau régulateur de la réponse immunitaire innée antivirale.

En conclusion, nos études sur le rôle d'IL-17RD dans la cancérogenèse et la signalisation immunitaire innée ont établi une fonction suppresseur de tumeur liée à une inflammation accrue *in vivo* et ont étendu sa fonction inhibitrice à la réponse cytoplasmique antivirale.

Mots-clés : IL-17RD, suppression tumorale, cancer colorectal, inflammation, inflammation et développement tumoral, immunité innée, signalisation des récepteurs cytoplasmiques aux acides nucléiques.

Abstract

Interleukin-17 receptor D (IL-17RD), also known as Similar expression to FGF genes (SEF) is a member of the IL-17 receptor family and a signaling hub that negatively regulates mitogenic signaling pathways, such as the ERK1/2 MAP kinase pathway, and innate immune signaling.

With the growing evidence that IL-17RD expression is down-regulated in a variety of solid tumors, we and others hypothesized that it may exert tumor suppressor functions. However, the role of IL-17RD in tumor biology remained to be studied *in vivo*.

In a first study, combining analysis of a longitudinal aging cohort and a colitis-associated colorectal cancer model, we uncovered that IL-17RD is as a *bona fide* tumor suppressor gene *in vivo*. We found that genetic disruption of *Il17rd* leads to increased tumor formation in both models. Interestingly, tumor development in the model of colitis-associated colorectal cancer was associated with an exacerbated inflammatory response. Because it is now generally accepted that inflammation and cancer are linked, and because no change in the proliferation and ERK1/2 MAP kinase activation of normal or tumor intestinal epithelial cells was observed upon genetic inactivation of IL-17RD, our findings establish IL-17RD as a tumor suppressor that exerts its function by limiting the extent and duration of inflammation. We further showed that depletion of IL-17RD enhances Toll-like receptor and IL-17A signaling in colon adenocarcinoma cells.

In a second study, we have evaluated the extent of the regulatory potential of IL-17RD in inflammation. Our study reveals that IL-17RD not only regulates TLR and IL-17 mediated innate immunity but also inhibits antiviral innate immunity mediated by nucleic acid sensors, namely RIG-I signaling. Our findings establish IL-17RD as a new regulator of antiviral innate immune response mediated by RIG-I.

Altogether, our studies on the role of IL-17RD in carcinogenesis and innate immune signaling have uncovered a tumor suppressor function linked to increased

inflammation *in vivo* and extended its inhibitory function to the antiviral cytoplasmic response.

Keywords: IL-17RD, tumor suppression, colorectal cancer, inflammation, inflammation and tumor development, innate immunity, acid nucleic sensor signaling.

Table des matières

RESUME.....	3
ABSTRACT.....	5
TABLE DES MATIERES.....	7
Liste des tableaux.....	16
Liste des figures.....	17
Liste des abréviations.....	21
REMERCIEMENTS.....	24

CHAPITRE 1

1 Introduction	28
1.1 La famille des récepteurs à l'interleukin-17	28
1.1.1 IL-17 et sa signalisation, éléments indispensables à la réponse antibactérienne	29
1.1.1.1 Des cytokines et des récepteurs	29
1.1.1.2 De la transduction du signal IL-17 à la transcription de gènes cibles	31
1.1.1.2.1 La transcription de gènes de novo via la régulation de facteurs de transcription.....	31
1.1.1.2.2 Contrôle de la stabilité de l'ARN messager et de la traduction.....	33
1.1.1.3 IL-17, de la réponse physiologique à la pathologie	34
1.1.1.3.1 Une signalisation clé pour la réponse antibactérienne et la réparation tissulaire.....	35
1.1.1.3.2 Une dérégulation de la signalisation à l'origine de maladies auto-immunes et du cancer	36
1.1.2 IL-17RD : un récepteur « quasi » orphelin.....	37

1.1.2.1	Identification et structure	37
1.1.2.2	De nombreux partenaires d'interaction	38
1.1.2.3	Sa régulation	40
1.1.3	Conclusion.....	40
1.2	Un rôle controversé d'IL-17RD dans la carcinogénèse	41
1.2.1	IL-17RD : Un potentiel suppresseur de tumeur	41
1.2.1.1	La perte d'expression d'IL-17RD dans les cancers.....	41
1.2.1.2	IL-17RD, un inhibiteur des voies mitogéniques.....	42
1.2.1.2.1	Une régulation de certains récepteurs tyrosine kinase.....	45
1.2.1.2.2	Une régulation des voies des MAPKs en aval des RTKs et/ou induites par d'autres récepteurs	48
1.2.1.3	IL-17RD et les voies mitogéniques: des conséquences biologiques pour la cellule	48
1.2.1.3.1	Un impact sur la prolifération et la survie.....	49
1.2.1.3.2	Un impact sur la migration et l'invasion	49
1.2.1.3.3	IL-17RD, un potentiel thérapeutique futur?.....	50
1.2.2	Une régulation de l'expression d'IL-17RD par les micro-ARN: Quelques cas d'induction de cancers	51
1.2.2.1	L'interférence par ARN.....	51
1.2.2.2	Une surexpression d'IL-17RD aux conséquences inattendues.....	51
1.2.2.2.1	MiR-193a-3p et le cancer colorectal	51
1.2.2.2.2	MiR-518a-5p et les gliomes/glioblastomes	52
1.2.2.2.3	MiR-506 et le carcinome papillaire de la thyroïde.....	52
1.2.3	Conclusion.....	52

1.3	IL-17RD : Un régulateur de l'inflammation par une modulation de l'immunité innée.....	53
1.3.1	Le système immunitaire inné, première réponse aux pathogènes	53
1.3.1.1	Les PRRs membranaires : Récepteurs de type Toll	54
1.3.1.2	Les PRRs cytoplasmiques.....	58
1.3.1.2.1	Les récepteurs cytoplasmiques antibactériens : NLRs	58
1.3.1.2.2	Les récepteurs cytoplasmiques antiviraux : RLRs	58
1.3.2	Le système immunitaire adaptatif, pour une réponse plus tardive et ciblée	59
1.3.3	IL-17RD et l'inflammation	59
1.3.3.1	Les voies de l'inflammation modulées par IL-17RD	59
1.3.3.1.1	La signalisation NF- κ B induite par IL-17.....	59
1.3.3.1.2	La signalisation NF- κ B induite par IL-1R/TLR	60
1.3.3.2	Les conséquences biologiques induites par l'expression d'IL-17RD sur l'inflammation.....	61
1.3.4	Conclusion.....	61
1.4	L'inflammation chronique: Un environnement propice au développement tumoral.....	62
1.4.1	De l'inflammation au cancer	62
1.4.1.1	Les types d'inflammation associés au cancer	62
1.4.1.2	Les facteurs clés dans l'inflammation liée aux cancers.....	65
1.4.1.2.1	L'inflammation induite par les oncogènes.....	65
1.4.1.2.2	Le facteur de transcription NF- κ B	66
1.4.1.2.3	Les cytokines et chimiokines	67
1.4.1.2.4	Quelques mécanismes supplémentaires suggérés	67
1.4.2	La carcinogénèse colorectale associée à la colite ulcéreuse	68

1.4.2.1	Les spécificités du cancer colorectal associé aux maladies d'inflammation de l'intestin	68
1.4.2.1.1	Cancer colorectal sporadique vs. cancer colorectal associé à la colite...	68
1.4.2.1.2	La barrière épithéliale intestinale dans le contrôle des infections microbiennes.....	70
1.4.2.1.3	De l'inflammation chronique au cancer colorectal associé aux maladies de l'inflammation de l'intestin	72
1.4.2.2	Thérapies actuelles contre le cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse.....	75
1.4.3	Conclusion.....	75
1.5	Objectifs.....	76
1.5.1	Objectif général	76
1.5.2	Objectifs spécifiques.....	76
1.6	Références.....	78

CHAPITRE 2

2	Loss of Interleukin-17 Receptor D promotes chronic inflammation-associated tumorigenesis.....	104
2.1	Mise en contexte.....	105
2.2	Contribution des auteurs.....	106
2.3	Abstract.....	107
2.4	Introduction	108
2.5	Results.....	110
2.5.1	Il17rd is a tumor suppressor gene in mice.....	110
2.5.2	Loss of IL-17RD promotes colitis-associated colorectal tumorigenesis .	113

2.5.3	IL-17RD deficiency does not affect normal or transformed intestinal cells proliferation	115
2.5.4	Loss of IL-17RD exacerbates inflammatory responses in colitis-associated colorectal cancer	118
2.5.5	IL-17RD restrains DSS-induced colonic inflammation.....	121
2.5.6	Down-regulation of IL-17RD increases TLR and IL-17 signaling in colorectal cancer cells	123
2.6	Discussion.....	126
2.7	Methods	130
2.8	Acknowledgements.....	136
2.9	References.....	137
2.10	Additional Information	142
2.10.1	Supplementary Figures	142
2.10.2	Supplementary Table	146

CHAPITRE 3

3	Le système immunitaire inné de reconnaissance des acides nucléiques cytoplasmiques	148
3.1	La reconnaissance des ARNs viraux cytoplasmiques	149
3.1.1	RIG-I et MDA5, des récepteurs cytoplasmiques pour les ARNs viraux..	149
3.1.2	MAVS, une protéine adaptatrice pour la transmission du signal	151
3.1.3	Les régulateurs des récepteurs de type RIG-I.....	153
3.2	La reconnaissance des ADNs cytoplasmiques.....	155
3.2.1	La détection directe et indirecte d'ADN	155
3.2.2	STING, une protéine adaptatrice pour la transmission du signal induit par cGAS.....	156

3.2.3	La reconnaissance des ADNs et l'auto-immunité.....	158
3.3	Conclusion.....	158
3.4	Références.....	160

CHAPITRE 4

4 Interleukin-17 Receptor D is a negative regulator of nucleic acid sensor signaling..... 170

4.1	Mise en contexte.....	171
4.2	Contribution des auteurs.....	172
4.3	Abstract.....	173
4.4	Introduction.....	174
4.5	Results.....	176
4.5.1	Loss of Il17rd promotes poly(I :C) induced innate immune response	176
4.5.2	IL-17RD negatively regulates RIG-I and TRIF signaling pathways but not cGAS-STING.....	178
4.5.3	IL17RD interacts with a potentially ubiquitinated form of RIG-I	180
4.5.4	A physiological role for IL-17RD in mice: the VSV challenge mouse model.....	181
4.6	Discussion.....	182
4.7	Methods.....	184
4.8	Acknowledgement	188
4.9	References.....	189
4.10	Additional Information	194

CHAPITRE 5

5 Discussion..... 196

5.1	Deux modèles indépendants pour démystifier le rôle d'IL-17RD dans la tumorigénèse	198
5.1.1	La lignée de souris knock out pour Il17rd : caractérisation, avantages et inconvénients	198
5.1.2	Une cohorte longitudinale de vieillissement : avantages et inconvénients.....	200
5.1.3	Le modèle de cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse induit par AOM-DSS : avantages et inconvénients.....	201
5.2	L'identification de nouvelles caractéristiques du suppresseur de tumeur IL-17RD.....	204
5.2.1	Il17rd est un gène suppresseur de tumeur haplo-insuffisant.....	204
5.2.2	Les femelles <i>Il17rd^{-/-}</i> ont une susceptibilité accrue pour la formation de tumeurs.....	205
5.2.3	Une nouvelle boucle de rétroaction positive a été identifiée	207
5.3	L'implication des voies mitogéniques et/ou de l'inflammation dans la carcinogénèse induite par la perte d'IL-17RD	209
5.3.1	Des voies mitogéniques non altérées dans les deux modèles?.....	209
5.3.2	Une inflammation accrue dans les deux modèles	212
5.4	Le modèle AOM-DSS soulève plusieurs questions	213
5.4.1	Une piste vers le ou les compartiment(s) responsable(s) de l'impact d'IL-17RD sur la tumorigénèse	213
5.4.2	Implication de cellules productrices d'IL-17A et F	217
5.4.3	Un intérêt grandissant pour IL-17 et IL-17RD.....	219
5.5	Au-delà de sa fonction dans la carcinogénèse	221
5.5.1	Une nouvelle fonction d'IL-17RD dans le métabolisme lipidique.....	221
5.5.2	Un nouveau rôle d'IL-17RD dans l'immunité innée antivirale	221

5.6	Conclusion et perspectives.....	224
5.7	Références.....	226

ANNEXE I

1	Deregulated ERK1/2 MAP kinase signaling promotes aneuploidy by a Fbxw7β-Aurora A pathway.....	236
1.1	Mise en contexte.....	237
1.2	Contribution des auteurs.....	238
1.3	Abstract.....	239
1.4	Introduction	240
1.5	Results.....	242
1.5.1	Activated MEK1DD and H-RasV12 induce cytokinesis defects leading to polyploidization	242
1.5.2	Aurora A is a critical mediator of H-RasV12-induced cytokinesis failure	244
1.5.3	Oncogenic H-RasV12 induces polyploidization through ERK1/2 MAPK signaling.....	246
1.5.4	Hyperactivation of the ERK1/2 pathway downregulates Fbxw7 β expression.....	248
1.5.5	Fbxw7 β isoform regulates Aurora A levels and the accuracy of cell division.....	251
1.6	Discussion.....	254
1.7	Methods.....	257
1.8	Acknowledgement	262
1.9	References.....	263
1.10	Supplementary figures.....	269

ANNEXE II

2	Loss of Interleukin-17 Receptor D modulates lipid metabolism	276
2.1	Contribution des auteurs	277
2.2	Mise en contexte et résultats	278
2.3	Figures.....	280

Liste des tableaux

CHAPITRE 2

Tableau 1. – List of primer sequences used for qPCR analysis 146

CHAPITRE 4

Tableau 1. – List of primer sequences used for qPCR analysis 194

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1. – La famille de la cytokine IL-17 et ses récepteurs.	30
Figure 2. – Activation de la signalisation IL-17.	33
Figure 3. – Représentation schématique de la structure d'IL-17RD et ses isoformes....	38
Figure 4. – Les cascades majeures des MAPK chez les mammifères.....	43
Figure 5. – Le réseau de signalisation FGFR.	47
Figure 6. – Plusieurs membres de la famille des TLRs peuvent détecter des PAMPs sur des microorganismes indépendants.	55
Figure 7. – La voie de signalisation TLR.	57
Figure 8. – Les types d'inflammation associés à la tumorigénèse et au cancer.....	63
Figure 9. – Une comparaison du développement en plusieurs étapes du cancer associé aux maladies de l'inflammation de l'intestin (haut) et du cancer colorectal sporadique (bas).....	69
Figure 10. – Les cellules épithéliales intestinales (IECs) forment une barrière physique et biochimiques qui maintient la ségrégation entre les communautés microbiennes luminales et le système immunitaire mucosal.	71

CHAPITRE 2

Figure 1. – IL-17RD supprime la formation spontanée de tumeurs chez les souris âgées.....	112
Figure 2. – La perte de IL-17RD favorise la tumorigénèse colorectale associée à la colite.. ...	114
Figure 3. – IL-17RD n'a pas d'effet autonome sur la prolifération des cellules intestinales.....	116
Figure 4. – La perte de IL-17RD exacerbe la réaction inflammatoire dans la colite associée au cancer colorectal.....	119
Figure 5. – L'expression de IL-17RD restreint l'inflammation intestinale induite par le DSS.....	122
Figure 6. – La régulation à la baisse de IL-17RD augmente la signalisation des TLR et de IL-17 dans les cellules du cancer colorectal.....	124
Figure 7. – L'expression du gène <i>IL17RD</i> est diminuée dans le cancer colorectal humain...	129

Figure S1. – Age-related tumor formation in <i>Il17rd</i> mutant mice.....	142
Figure S2.– Effect of IL-17RD deficiency on tumor cell proliferation, apoptosis and angiogenesis.....	143
Figure S3.– Gene enrichment and pathway analysis of the transcriptomes of wild type and <i>Il17rd</i> ^{-/-} colon tumors.....	144
Figure S4.– Loss of IL-17RD leads to chronic inflammation in aging mice.....	145
Figure S5.– Loss of IL-17RD promotes TLR and IL-17A signaling in colitis-associated colorectal cancer.....	145

CHAPITRE 3

Figure 1. – Les récepteurs de type RIG-I (RLR) ont été identifiés comme des capteurs d'ARN viraux cytoplasmiques importants qui reconnaissent l'ARN génomique et / ou les intermédiaires de réplication de l'ARN de nombreux virus.....	152
Figure 2. – Dans le cytoplasme des cellules infectées, la GMP – AMP synthase cyclique (cGAS) reconnaît l'ADN double brin (ADNdb) des virus à ADN ou l'ADNdb produit par les rétrovirus grâce à la transcription inverse de leurs génomes à ARN.	157

CHAPITRE 4

Figure 1. – IL-17RD suppresses RIG-I mediated immune response in MC-38 cells....	177
Figure 2. – IL-17RD inhibits RIG-I mediated ISRE and NF-kB luciferase activities.....	179
Figure 3. – IL-17RD interacts with a potentially ubiquitinated form of RIG-I.....	180
Figure S1. – IL-17RD suppresses RIG-I mediated immune response in A549.....	194

CHAPITRE 5

Figure 1. – The role of <i>Il17rd</i> seems sex-dependent in mice treated with AOM-DSS. .	206
Figure 2. – Loss of IL-17RD does not increase MAPK/ERK1/2 activation in ageing mice.....	210

Figure 3. – Syngeneic allografts for the identification of intrinsic and immune implications in tumorigenesis upon loss of <i>Il17rd</i>	215
Figure 4. – Loss of <i>Il17rd</i> in either epithelial or immune compartments induce anti-tumoral response to syngenic allografts in mice.	216
Figure 5. – IL-17A and F are significantly increased in <i>Il17rd</i> ^{-/-} CAC tumors.....	218
Figure 6. – PUBMED results per year for IL-17 and IL-17RD from 1990 until 2019.....	220
Figure 7. – <i>Il17rd</i> ^{-/-} mice exhibit smaller spleens than WT mice without any impact on the thymus.....	222
Figure 8. – Loss of IL-17RD induce innate immunity-linked gene signatures in the spleen.....	223

ANNEXE I

Figure 1. – Activated H-Ras ^{V12} or MEK1DD induce cytokinesis defects..	243
Figure 2. – Overexpression of Aurora A impairs cytokinesis and cell division.....	245
Figure 3. – H-Ras ^{V12} -induced cytokinesis failure is mediated by the ERK1/2 pathway.	247
Figure 4. – Hyperactivation of ERK1/2 signaling downregulates Fbxw7 β expression..	249
Figure 5. – ERK1/2 activity inversely correlates with Fbxw7 β expression in MEK2DD transgenic mice.	250
Figure 6. – Fbxw7 β isoform regulates Aurora A levels and the accuracy of cell division.....	252
Figure S1. – Hyperactivation of Ras or MEK signaling leads to cell division defects.....	269
Figure S2.– Oncogenic activation of Ras upregulates Aurora A expression in Cdh1 ^{GT/GT} MEFs.....	270
Figure S3.– Hyperactivation of ERK1/2 signaling by oncogenic Ras downregulates Fbxw7 β expression in mammary epithelial MCF10A cells.....	271
Figure S4.– Generation of a transgenic mouse model conditionally expressing activated MEK2DD in the intestine	271
Figure S5.– Fbxw7 isoforms regulate the accuracy of cell division.....	272

Figure S6.– Fbxw7 β isoform specifically regulates Aurora A levels in MCF10A cells.....273

ANNEXE II

Figure 1. – La perte d'IL-17RD inhibe l'expression d'apolipoprotéines..280
Figure 2. – IL-17RD inhibe la production d'enzymes de la lipogenèse *de novo*.....281
Figure 3. – La perte d'IL-17RD induit une augmentation de triglycérides dans le sang.281

Liste des abréviations

A-B

ARNm ARN messenger

AOM Azoxyméthane

C-D

c.-à-d. C'est à dire

CAC Cancer colorectal associé à la colite

CARD Domaine de recrutement et d'activation de la caspase

DSS Dextran sulfate sodium

E-F-G-H

ErbB ou EGFR Récepteur aux facteurs de croissance épidermique

ERK Kinase régulée par les signaux extracellulaires

FGF Facteur de croissance des fibroblastes

FGFR Récepteur aux facteurs de croissance des fibroblastes

I

IFN Interféron

IL Interleukine

IRF Facteur de régulation des IFNs

ISG Gène stimulé par l'IFN

J-K-L

JNK Kinase c-jun N-terminale

LPS Lipopolysaccharide

M-N-O

MAPK Kinase associée aux protéines activées par les mitogènes

MAVS Protéine de signalisation mitochondriale antivirale

MDA5 Protéine 5 associée à la différenciation des mélanomes

miARN Micro-ARN

P-Q-R-S

p. ex. Par exemple

RIG-I Gène I inductible par l'acide rétinoïque

RLR Récepteur de type RIG-I

SEF Expression similaire aux gènes FGF (*Similar expression to FGF*)

STING Protéine stimulatrice des gènes IFNs

T-U-V

TGF- β Facteur de croissance transformant

TLR Récepteur de type Toll

TNF Facteur de nécrose tumorale

TNFR Récepteur aux facteurs de nécrose tumorale

UC Colite ulcéreuse (*Ulcerative colitis*)

W-X-Y-Z

WT Souche sauvage

A mes parents et ma sœur

“Nothing worth doing will ever be easy”

Mike Horn

Remerciements

Ce travail n'aurait pas été possible sans les conseils généreux et le soutien de nombreuses personnes. Premièrement, j'aimerais remercier **Sylvain Meloche**, mon directeur de recherche pour m'avoir donné l'opportunité de faire partie de son équipe. Je te remercie aussi pour tes conseils et ton soutien au cours de ma thèse un tant soit peu sinieuse. Je dois aussi remercier **Marc Servant** qui a énormément contribué aux discussions et à l'avancée des projets de cette thèse. Merci pour ton soutien, tes conseils et ta disponibilité.

Je voudrais remercier les membres du jury d'évaluation de ma thèse pour leur temps et leur contribution à l'avancée du projet : **Jean-Philippe Gratton**, **Christian Beauséjour** et **Nicole Beauchemin**. Je remercie aussi les **Fonds de Recherche du Québec-Santé** pour leur contribution au financement de cette thèse.

J'aimerais remercier tous les membres passés et présents du « **labo Meloche** ». Plus particulièrement, je remercie **Pierre-Luc Tanguay** de m'avoir délibérément pris sous ton aile à mon arrivée, de m'avoir appris tant de techniques et pour toutes les précieuses discussions scientifiques. Je n'aurais pas rêvé meilleur mentor. « Always fifty » reste mon mot d'ordre quand je lance une nouvelle PCR. Merci aussi à **Marjorie** pour ton soutien et pour toutes les discussions scientifiques (...ou autres) qu'on a pu avoir, accompagnées de « quelques » Expressos. Merci à **Mathilde** et **Joaquim** pour votre soutien, votre aide technique de post-doctorants aguerris et vos commentaires sur certaines sections de cette thèse. Mathilde, je retiendrai toutes nos courses à pied jusqu'au sommet du Mont Royal qui nous aidaient à nous vider la tête entre midi et deux, qu'il pleuve, qu'il vente, qu'il neige! Finalement je remercie tous les membres actuels du laboratoire pour leur soutien, leur aide et pour avoir contribué à une bien bonne ambiance de travail durant ces dernières années de thèse.

Un merci tout particulier à **Céline Laumont**, ancienne « Iriquoise » et très chère amie, tu as été d'un soutien incroyable jusqu'à la dernière minute, on est capables! Une thèse, ne serait-ce pas comme grimper 3 fois le Mont Katahdin en 9 jours, 20kg sur le

dos? Une aventure mentale et physique comme aucune autre dont le paysage en vaut la chandelle!

Enfin, j'aimerais exprimer mon immense gratitude envers **ma sœur** et **ma maman** pour m'avoir encouragé à entreprendre ce projet et soutenu dans mon ^{nième} départ à l'étranger et tout au long de cette thèse. Plus particulièrement, je vous remercie de m'avoir accompagné dans la rédaction, merci pour les nombreuses relectures et les encouragements. Quelle aventure en cette période de Pandémie!

Chapitre 1

1 Introduction

Partie A : L'interleukin-17RD dans le cancer et l'inflammation

Le système immunitaire et ses composantes, (i) le système immunitaire inné et (ii) le système immunitaire adaptatif jouent un rôle primordial et complémentaire afin d'assurer une protection à l'organisme contre de potentiels pathogènes, tout en préservant, autant que possible, l'intégrité des tissus. Une fois la barrière épithéliale franchie par un microorganisme, les composantes de l'immunité innée vont d'abord agir rapidement, en quelques minutes, au site de l'infection pour lutter contre l'envahisseur. Dans ce contexte, un groupe de cytokines, les interleukines (IL) produites par les globules blancs (leucocytes, d'où *leukin*) sont sécrétées et ont pour fonction principale d'assurer une communication entre ces derniers (d'où *inter*) pour induire directement ou indirectement une réponse aux pathogènes. Elles sont ainsi considérées comme « les hormones qui régulent les réponses immunitaires et inflammatoires »¹. L'immunité adaptative, plus lente agit de concert avec l'immunité innée pour orchestrer une réponse immune spécifique du pathogène.

1.1 La famille des récepteurs à l'interleukin-17

On compte une centaine de **cytokines** classées suivant leur homologie de structure. Chaque cytokine peut être synthétisée par plusieurs types de cellules et agir sur un grand nombre de cellules cibles. Elles agissent par l'intermédiaire de récepteurs n'ayant pas d'activité enzymatique propre mais étant associés à d'autres protéines cellulaires pour induire un signal. Parmi elles, on trouve donc les **interleukines**, les **chimiokines**, le **facteur de nécrose tumorale α** (TNF- α), et les **interférons** (IFNs). Et parmi les interleukines, on trouve la famille de l'interleukin-17 (IL-17) et son récepteur principal IL-17RA découverts dans les années 90 ^{2,3}.

1.1.1 IL-17 et sa signalisation, éléments indispensables à la réponse antibactérienne

1.1.1.1 Des cytokines et des récepteurs

La famille de l'IL-17 est composée de **six cytokines IL-17A (IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), et IL-17F**. IL-17A et IL-17F sont les cytokines typiques et les deux homologues (~ 60%) les plus proches de la famille. Leurs gènes sont localisés sur des locus voisins du chromosome 6 contrairement aux autres ligands dont les gènes sont localisés sur des chromosomes indépendants. L'IL-17 est synthétisé par certaines cellules immunitaires et ainsi que les cellules épithéliales. En effet, la source principale de ces deux cytokines sont les lymphocytes T auxiliaires Th17⁴. D'autres sous-types de cellules de l'immunité innée telles que les cellules $\gamma\delta$, les cellules tueuses naturelles invariantes (iNKT), les cellules de type inductrices de tissu lymphoïde (LTi), les cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules myéloïdes⁵, de même que certaines cellules épithéliales dont les cellules de Paneth de l'intestin sont également capables de produire l'IL-17A et F⁶. IL-17A et F peuvent s'associer entre elles sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère pour se lier à leurs récepteurs⁷⁻¹⁰.

La famille des récepteurs à l'IL-17 (IL-17R) comprend **cinq sous-unités, IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD et IL-17RE**. IL-17RA est le récepteur principal de la famille. C'est un récepteur transmembranaire muni d'un domaine extracellulaire et d'une longue queue cytoplasmique atypique^{3,11}. Celle-ci est composée d'un domaine intracellulaire commun à tous les membres de la famille des récepteurs à l'IL-17, le domaine SEFIR (« similar expression to fibroblast growth factor » et IL-17R), qui est un motif relié au domaine Toll/IL-1R¹² présent sur le récepteur à l'IL-1 et les membres des récepteurs de type Toll (TLR)¹³; et de deux domaines intracellulaires uniques, une extension de ~ 100 résidus du domaine SEFIR, le domaine SEFEX^{14,15} et un domaine d'activation du facteur de transcription CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)- β , CBAD responsable d'une régulation négative de la signalisation^{15,16}. De la même manière que ses ligands, les récepteurs à l'IL-17 sont capables de s'associer en homodimère ou plus souvent en

hétérodimère afin de lier leur ligand, transmettre un signal ou remplir leur fonction. Cette dimérisation a lieu via deux domaines extracellulaires de type fibronectine III¹⁷, communs aux classes 1 et 2 des récepteurs aux cytokines, ils permettent aussi la liaison aux ligands^{18,19} (**Figure 1.**).

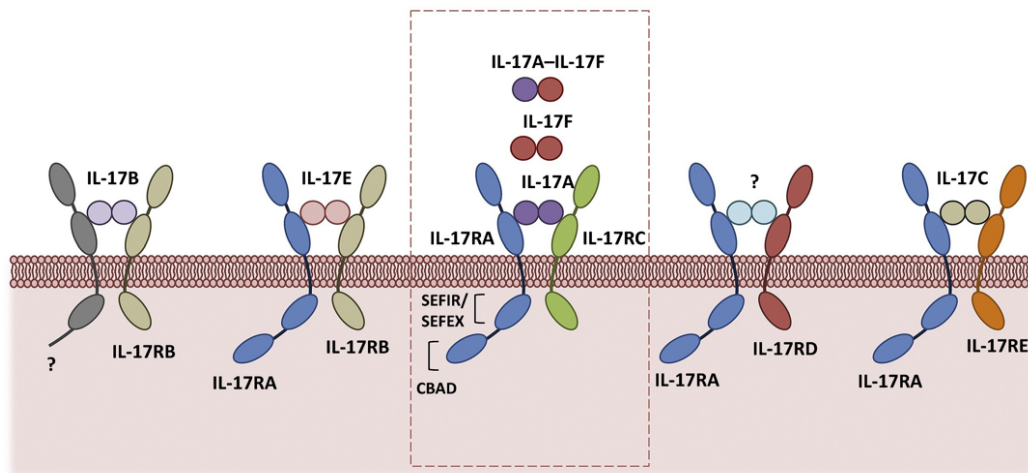


Figure 1. – La famille de la cytokine IL-17 et ses récepteurs. IL-17A est la cytokine principale et typique de la famille de l'IL-17 qui comprend cinq autres cytokines. Son homologue IL-17F est le deuxième ligand bien caractérisé de la famille. La famille des récepteurs à l'IL-17 est composée de cinq différents récepteurs. Le membre principal de la famille des récepteurs à l'IL-17 est IL-17RA qui détient un domaine cytoplasmique commun avec les autres membres de la famille, appelé domaine SEFIR. Par ailleurs, IL-17RA est aussi composé d'une extension du domaine SEFIR appelé SEFEX et d'un domaine inhibiteur CBAD. Abréviations : SEFIR, domaine SEF/IL-17R; SEFEX, extension de SEFIR; CBAD, domaine d'activation de C/EBP β . Adapté avec permission de Springer Nature : Trends in Immunology (Amatya N, Garg AV and Gaffen SL)²⁰ © 2017

Alors que certaines des cytokines et leurs récepteurs sont bien caractérisés (p. ex., IL-17RA/IL-17RC et IL-17A/IL-17F) et connus pour induire la signalisation IL-17 (**section 1.1.1.2**), d'autres restent moins étudiés et par conséquent moins bien caractérisés. D'abord, IL-17RB semble agir comme récepteur du ligand IL-17B, lui conférant un rôle potentiel dans plusieurs types de cancer²¹. Ensuite, IL-17RE est un

récepteur potentiel du ligand IL-17C lui conférant un rôle dans l'inflammation et l'immunité²². Pour finir, IL-17RD a longtemps été considéré comme un récepteur orphelin. Cependant, selon une étude récente, il semble finalement agir comme un récepteur pour l'IL-17A lui conférant un rôle dans l'inflammation²³. De plus, sa fonction de protéine d'ancrage pour certains récepteurs et protéines cytoplasmiques (**section 1.1.2.2**) lui confère des rôles dans les cancers (**section 1.2**), l'inflammation (**section 1.3**) ainsi que dans le développement.

1.1.1.2 De la transduction du signal IL-17 à la transcription de gènes cibles

Suite à la stimulation par l'IL-17, c'est le complexe IL-17RA/IL-17RC qui initie l'activation en aval de voies de signalisations pour induire la production de **molécules pro-inflammatoires**²⁴. IL-17A induit ainsi une cascade d'événements qui mènent au recrutement de neutrophiles²⁵, à l'inflammation et la défense de l'hôte²⁶. IL-17 augmente l'expression de gènes liés à l'inflammation grâce à deux voies principales, (i) en induisant la transcription de gènes *de novo*, (ii) en stabilisant les ARN messagers (ARNm) cibles transcrits.

1.1.1.2.1 La transcription de gènes de novo via la régulation de facteurs de transcription

Premièrement, suite à l'engagement du récepteur à l'IL-17, le récepteur s'associe avec la protéine adaptatrice Act-1^{27,28 29,30}. Act-1 est une E3 ubiquitine ligase capable de recruter et ubiquitiner TRAF6, une autre E3 ubiquitine ligase³¹. L'ubiquitination de TRAF6 génère un échafaudage pour le recrutement et l'activation de la kinase TAK1 et du complexe inhibiteur de la kinase NF- κ B (IKK) composé de IKK α , IKK β , et IKK γ ^{27,32-34}. Ce recrutement induit ensuite **la voie canonique de NF- κ B**. Ainsi, IKK phosphoryle la sous-unité I κ B du complexe NF- κ B:I κ B, marquant I κ B pour sa dégradation par le protéasome. La dégradation de I κ B expose un signal de localisation nucléaire sur NF- κ B, le libérant pour une translocation nucléaire et la transcription de gènes pro-inflammatoires³⁵. La signalisation IL-17 n'active pas la voie non canonique de NF- κ B. Ainsi, la plupart des gènes cibles de l'IL-17 sont issus de la délocalisation nucléaire d'éléments promoteurs de la voie canonique, p50 et p65³⁶ (**Figure 2**).

Deuxièmement, IL-17 active également **la voie des kinases associées aux protéines activées par les mitogènes (MAPK)**, incluant la kinase régulée par les signaux extracellulaires (ERK1/2)³⁷, p38 et la kinase c-JUN N-terminale (JNK)³⁸. Suite à la stimulation par l'IL-17, IKK induit aussi la phosphorylation de p105, libérant la kinase TPL2 qui active à son tour p38 et JNK. De manière intéressante, l'axe TPL2-TAK1 active IKK, créant ainsi une boucle de rétroaction positive qui renforce l'induction de gènes. Alors que TPL2 peut induire la signalisation ERK1/2 dans certains contextes de signalisation TLR, ce n'est pas le cas dans la signalisation IL-17^{39,40}. En effet, le mécanisme d'activation de la voie ERK1/2 par IL-17 est encore mal connu. Une dernière étude montre que l'IL-17 est capable d'activer la formation d'un complexe IL-17R-ACT1-TRAF4-MEKK3-MEK5. Ce complexe active ERK5 induisant des gènes cibles liés à la prolifération de kératinocytes et à la formation de tumeurs⁴¹ (**Figure 2.**).

Enfin, IL-17 est aussi capable d'induire une activation des **facteurs de transcription C/EBP** (C/EBP β et C/EBP δ) agissant potentiellement comme répresseurs de la signalisation^{42,43} (**Figure 2.**).

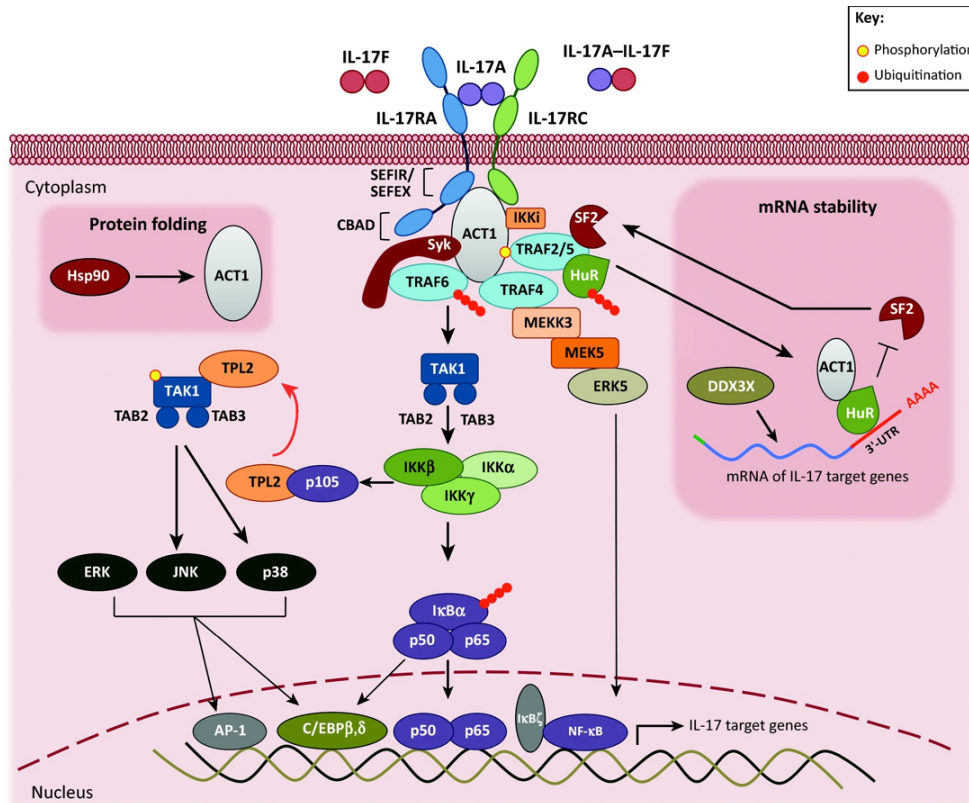


Figure 2. – Activation de la signalisation IL-17. La signalisation IL-17 démarre avec la liaison des cytokines IL-17A/A, IL-17A/F, ou IL-17F/F à leurs récepteurs IL-17RA et IL-17RC. Suite à la liaison du ligand, Act1 active de multiples voies de signalisation indépendantes opérant via différentes protéines TRAF. L'Activation de TRAF6 résulte en l'activation des voies NF-κB, C/EBPβ, C/EBPδ, et MAPK. Le complexe IL17R-Act1 s'associe aussi à MEKK3 et MEK5 via TRAF4, menant à l'activation de ERK5. Alors que les signalisations IL-17 médiées par TRAF6 et TRAF4 résultent en la transcription de gènes inflammatoires, la signalisation IL-17 médiée par le complexe ACT1-TRAF2-TRAF5 résulte en un contrôle de la stabilité de gènes cibles d'IL-17. Abréviations: ERK, kinase régulée par les signaux extracellulaires; Hsp, protéine de choc thermique; HuR, antigen humain R; IKK, inhibiteur de la kinase κB; JNK, kinase c-JUN N-terminale; SF2: facteur d'épissage 2; TAK1, kinase TGF-β activatée; TRAF, facteur associé au récepteur TNF; UTR, région non transcrite. Adapté avec permission de Springer Nature : Trends in Immunology (Amatya N, Garg AV and Gaffen SL)²⁰ © 2017

1.1.1.2.2 Contrôle de la stabilité de l'ARN messenger et de la traduction.

Plusieurs des cytokines et chimiokines inflammatoires induites par IL-17 sont intrinsèquement **instables**. Ainsi, outre l'augmentation de la synthèse de gènes

inflammatoires *de novo*, IL-17 promeut l'expression d'un grand nombre de gènes cibles en contrôlant la stabilité de leur ARNm. Les transcrits stabilisés sont ensuite stockés dans des granules⁴⁴. La voie de stabilisation de l'ARNm induite par IL-17 est dépendante du recrutement du complexe Act1-TRAF2-TRAF5⁴⁵ qui séquestre des facteurs de désintégration de l'ARN (tel que le facteur de régulation de l'épissage d'ARNm, SF2) loin de la région non traduite 3' (3'-UTR) des ARNm nouvellement transcrits. Cette séquestration prévient ainsi leur dégradation^{46,47}. D'autres protéines de liaison à l'ARN (RBPs) tels que HuR ou DDX3X agissent de manière positive pour accroître l'expression de gènes cibles d'IL-17^{46,48} (**Figure 2.**).

En outre, IL-17 détient le pouvoir d'amplifier l'induction de cytokines inflammatoires grâce à sa **capacité à coopérer avec d'autres stimuli**. En plus de coopérer avec des cytokines qui activent la voie NF- κ B telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α ^{43,49,50} ou la lymphotoxine⁵¹, IL-17 peut aussi coopérer avec les cytokines IFN- γ , IL-13 et le facteur de croissance transformant (TGF)- β ⁵². Finalement, afin de temporiser la réponse inflammatoire et rendre le signal transitoire, la signalisation IL-17 est également finement régulée par plusieurs mécanismes composés d'ubiquitines (TRAF3, TRAF4 et β TrCP)^{53,54}, déubiquitines (A20 et USP25)^{55,56}, kinases (TBK1 et GSK3b) et micro-ARNs (miARN)(miR-23b et miR30a)^{20,57,58}.

1.1.1.3 IL-17, de la réponse physiologique à la pathologie

Dans l'évolution, IL-17 est une cytokine ancienne et de manière non surprenante, ses effets principaux ont lieu sur l'immunité innée. Dans cette partie, IL-17 fait référence à IL-17A qui est la cytokine principale à l'origine des fonctions décrites ci-dessous. IL-17F étant aussi parfois impliqué joue généralement un rôle plus modeste. Ainsi, IL-17 joue un rôle essentiel dans la **défense de l'hôte** contre des infections microbiennes, mais aussi dans la **réparation tissulaire**. Par conséquent, une production pathologique de l'IL-17 mène à une inflammation excessive et induit des dommages tissulaires. Ainsi, elle est impliquée dans de multiples conditions inflammatoires comme des **maladies auto-**

immunes, métaboliques et les cancers. De cette façon, elle fait récemment l'objet de nombreuses nouvelles études, et représente une cible thérapeutique intéressante.

1.1.1.3.1 Une signalisation clé pour la réponse antibactérienne et la réparation tissulaire

La signature de gènes induits par la signalisation IL-17 comprend de nombreuses **cytokines pro-inflammatoires**, des **chimiokines**, des **peptides antimicrobiens** (AMPs), des **metalloprotéinases de la matrice** (MMPs) et d'autres effecteurs inflammatoires^{52,59}. Cette signature lui confère un rôle important dans la réponse antibactérienne lorsque et si le pathogène réussit à envahir l'épithélium concerné. La fonction principale de l'IL-17 consiste à induire fortement le recrutement de **neutrophiles** grâce à la production de cytokines G-CSF, de la chimiokine CCL2 (MCP-1) et des chimiokines CXC provenant des cellules cibles non-hématopoïétiques⁶⁰. IL-17 a ainsi été associé à des réponses aux bactéries extracellulaires (*Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriae* et *Porphyromonas*), aux champignons (*Candida* et *Blastomyce*)⁶¹ ainsi qu'au microbiote commensal. IL-17 contribue également à l'immunité contre certains pathogènes intracellulaires tel que *Mycobacterium tuberculosis*^{62,63}.

En plus d'être essentiel pour la réponse de l'hôte, IL-17 est aussi vital pour la protection de la barrière par l'induction d'autres signatures de gènes spécifiques de certains tissus⁶⁴. D'un côté, IL-17 protège la barrière mucoale en maintenant les jonctions serrées de l'épithélium intestinal et induit l'expression de protéines antimicrobiennes telles que les β -defensines et calprotectines (S100A8/9) pour contrôler l'infection de la peau⁶⁵. Parallèlement, IL-17 stimule la régénération pour rétablir la fonction de la barrière en cas de dommage tissulaire en régulant la prolifération et différenciation des kératinocytes⁴¹. IL-17 induit la prolifération accrue de cellules progénitrices dans l'intestin de souris soumises à un protocole de colite induite par des agents chimiques⁶⁶, et l'expression de peptides antimicrobiens RegIIIy nécessaires à la cicatrisation de plaies de la peau⁶⁷.

1.1.1.3.2 Une dérégulation de la signalisation à l'origine de maladies auto-immunes et du cancer

Alors qu'une activité transitoire et régulée induit des réponses physiologiques de défense immunitaire et réparation tissulaire, une activité chronique de l'IL-17 induit des réponses pathologiques qui peuvent promouvoir l'auto-immunité, le cancer ou des dérèglements métaboliques.

Premièrement, les cellules immunitaires innées productrices d'IL-17 (Th17) jouent un rôle crucial dans la persistance de l'inflammation chronique et certaines maladies auto-immunes via un axe IL-23/IL-17 récemment découvert^{51,68,69}. Notamment, des évidences montrent que l'IL-17 promeut des **maladies auto-immunes** telles que l'arthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante et le psoriasis⁷⁰. De récents travaux suggèrent également un rôle de l'IL-17 et sa signalisation dans le développement de l'asthme⁷¹, et une épistasie a été observée pour les gènes impliqués dans l'axe IL-23/IL-17 chez des patients atteints de la maladie de Crohn suggérant un rôle d'IL-17 dans les maladies de l'inflammation chronique de l'intestin³⁷.

Deuxièmement, un nombre croissant d'évidences soutient un rôle pathogène d'IL-17 dans la formation de **cancers** du côlon, de la peau, du pancréas, du foie, des poumons et des myélomes^{66,72-78}. IL-17 serait impliqué dans les stades précoces et tardifs du développement du cancer en promouvant la régénération tissulaire, la tumorigénèse et la progression tumorale⁷⁹. Par exemple, dans l'intestin, l'IL-17 d'origine épithéliale contribue à la carcinogénèse induite par la colite. Alors que la colite endommage la barrière épithéliale, la réponse IL-17 antimicrobienne renforce l'inflammation locale et sa fonction dans la régénération tissulaire amplifie la prolifération des cellules tumorales et contribue ainsi à la croissance tumorale⁶⁶.

Finalement, de nouvelles fonctions pathologiques de l'IL-17 ont vu le jour. Notamment, de récentes études lui confèrent un rôle dans la **reprogrammation métabolique** des tissus lymphoïdes⁸⁰.

L'implication d'IL-17 dans ces maladies auto-immunes et dans les cancers incitent des recherches cliniques pour la découverte de nouveaux traitements. Actuellement, des inhibiteurs tels que des **anticorps monoclonaux** contre l'IL-17A (secukinumab et ixekizumab) ont déjà été approuvés pour le traitement de plaques de psoriasis modérées ou sévères et présentent une efficacité prometteuse avec disparition des plaques dans la majorité des cas⁸¹⁻⁸⁴ et sont aussi efficaces contre la spondylarthrite ankylosante et dans un sous type de patients atteints d'arthrite rhumatoïde⁸⁵. Des anticorps contre le récepteur IL-17RA (brodalumab) ont également vu le jour pour le traitement de la maladie de psoriasis⁸⁶. Cependant, l'efficacité du blocage de l'IL-17 pour d'autres maladies liées à l'inflammation chronique de l'intestin s'est avérée moins concluante (p. ex., la maladie de Crohn)^{87,88}.

1.1.2 IL-17RD : un récepteur « quasi » orphelin

IL-17RD, membre des récepteurs à l'IL-17 a été découvert environ 10 ans après la caractérisation du premier récepteur à l'IL-17. Tout d'abord identifié sous le nom de **SEF pour « Similar Expression to FGF »**, comme inhibiteur de la voie des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), ce récepteur fait plus récemment l'objet d'études en tant que régulateur de l'inflammation sous l'acronyme IL-17RD. Pour assurer une continuité entre tous les chapitres, j'utiliserai exclusivement l'acronyme IL-17RD pour référer à la protéine IL-17RD/SEF au cours de cette thèse.

1.1.2.1 Identification et structure

Dans un premier temps, IL-17RD a été découvert chez le poisson zèbre⁸⁹. Conservé à travers l'évolution des *vertebrae*, des homologues chez la souris, l'humain et le poulet ont ensuite été identifiés⁹⁰⁻⁹⁴. Son gène est localisé sur le chromosome 3 au locus unique 3p14.3 et un mécanisme d'**épissage alternatif** permet la génération de plusieurs isoformes ubiquitaires ayant des propriétés biochimiques et biologiques distinctes. Les principales isoformes sont, l'isoforme transmembranaire prototypique (hll17rd-a) et l'isoforme cytosolique (hll17rd-b)⁹¹ (**Figure 3.**).

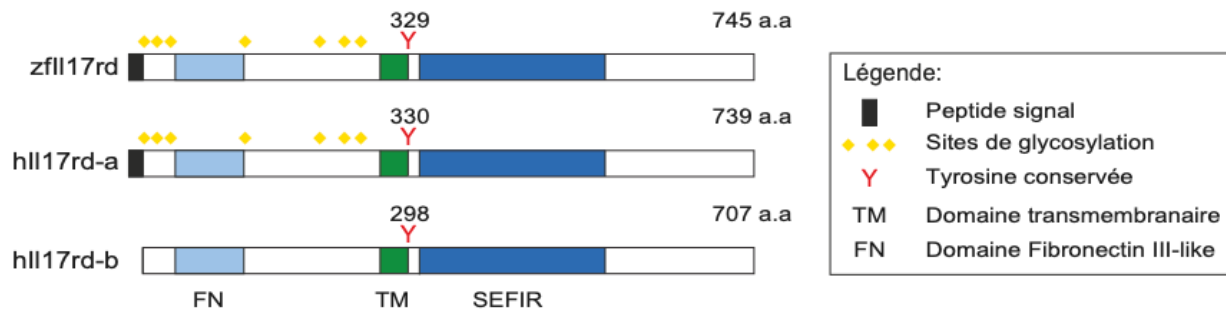


Figure 3. – Représentation schématique de la structure d’IL-17RD et ses isoformes. IL-17RD est une protéine transmembranaire découverte chez le poisson zèbre. Celle-ci est conservée chez l’homme sous deux isoformes. La forme longue hll17rd-a présentant un peptide signal et la forme courte hll17rd-b.

L’**isoforme prototypique transmembranaire hll17rd-a** est un récepteur localisé à la membrane plasmique^{91,93,95,96}. De même que les récepteurs à l’IL-17, il est muni d’un domaine extracellulaire composé de domaines FN et une queue cytoplasmique composée d’un **domaine SEFIR**. En outre, IL-17RD est capable de subir certaines modifications post-traductionnelles. En effet, il comprend un résidu Tyrosine (Y330) capable d’être phosphorylé, potentiellement via l’activation du récepteur aux FGF (FGFR)⁹⁷. De plus, il présente de nombreux sites de glycosylation sur son domaine extracellulaire. L’**isoforme cytosolique hll17rd-b** ne contient pas de peptide signal et est localisé au cytosol lorsque transfecté dans les cellules⁹¹.

1.1.2.2 De nombreux partenaires d’interaction

Comme tout récepteur aux cytokines, IL-17RD n’a pas d’activité enzymatique. Même si une étude récente lui suggère, pour la première fois, un rôle de récepteur pour la cytokine IL-17A²³, IL-17RD est plus fréquemment décrite comme une **protéine d’ancrage ou de séquestration**, capable d’interagir avec de nombreux partenaires tels que des récepteurs membranaires et des protéines cytoplasmiques. Les voies de signalisation affectées par ces interactions sont impliquées dans des processus de prolifération, survie, migration cellulaire ainsi que dans l’inflammation.

Parmi les **récepteurs** capables d'interagir avec IL-17RD, on compte le récepteur typique de la famille des récepteurs à l'IL-17, IL-17RA. L'interaction entre IL-17RA et IL-17RD a été démontrée par co-immunoprécipitation (coIP) dans les HEK293T et immunoprécipitation (IP) des protéines endogènes dans les MEFs et NIH3T3. De plus, l'utilisation de mutants a permis de déterminer que chacun des domaines intra et extracellulaires est capable d'interagir avec IL-17RA⁹⁸. Deuxièmement, plusieurs récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR) ont été identifiés comme interagissant avec IL-17RD. Il a été démontré par coIP que FGFR1 et FGFR2 interagissent avec le domaine intracellulaire d'IL-17RD dans des cellules de souris, et chez le xénope^{89,90,92,96,99}. Troisièmement, les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (ErbB ou EGFR) interagissent avec IL-17RD suite à une stimulation par l'EGF dans les HEK293T¹⁰⁰. Finalement, le récepteur aux facteurs de nécrose tumorale, (TNFR)2 interagit avec IL-17RD dans les cellules HK-2, 786-O et des cellules rénales de souris¹⁰¹.

IL-17RD est aussi capable d'interagir avec plusieurs **protéines cytoplasmiques** en aval de ces récepteurs. Premièrement, IL-17RD interagit avec MEK et Ras suite à l'activation des voies FGF/MAPK. En effet, IL-17RD co-immunoprécipite avec la forme active de MEK dans les C2C12 suite à une stimulation par FGF ou EGF^{95,102,103}. De plus, une étude indépendante a démontré par coIP que Ras et IL-17RD interagissent dans les cellules HEK293T¹⁰⁴. Deuxièmement, IL-17RD est capable d'interagir avec NF-κB, Myd88 et TRAF6 en aval de la voie TLR/IL1-R. En effet, il a d'abord été démontré par coIP qu'IL-17RD était capable d'interagir avec la sous unité p50 et non p65 de Nf-κB dans des HEK293T¹⁰⁵. De plus, une seconde étude plus récente du même groupe a démontré l'importance des domaines SEFIR et C-terminal pour son interaction avec NF-κB dans le même type cellulaire¹⁰⁶. Par ailleurs, des analyses de coIP d'IL-17RD WT, des mutants IL-17RDdeltaC et IL-17RD-SEFIR et certaines protéines adaptatrices démontrent qu'IL-17RD peut interagir avec Myd88 et Mal via son domaine SEFIR, toujours dans les HEK293T¹⁰⁷. Finalement, IL-17RD est capable de s'associer physiquement avec TAK1 suite à l'activation de la voie JNK comme cela a été démontré par coIP dans les

HEK293T¹⁰⁸. Encore une fois, cette étude montre l'importance du domaine C-terminal comprenant le domaine SEFIR pour permettre cette interaction.

Les fonctions d'IL-17RD associées à ces interactions sont décrites dans les **sections 1.2.1.2 et 1.3.3.1**.

1.1.2.3 Sa régulation

De manière intéressante et par un mécanisme encore inconnu, la **signalisation FGF** semble réguler l'expression d'IL-17RD à la baisse. En effet, une perte d'expression d'IL-17RD est observée dans la plaque neurale antérieure au stade de la gastrula chez le poisson zèbre⁸⁹. D'autres observations démontrent que son expression est également modulée à la baisse par l'activation de la **voie Ras/MAPK**. En effet, la suractivation de la voie par expression du mutant Ras^{v12} dans les cellules épithéliales intestinales de rat (IEC6) induit une perte d'expression d'IL-17RD observée par immunobuvardage¹⁰³. A l'inverse, une grande quantité de **micro-ARNs** sous exprimés dans les cancers sont impliqués directement ou indirectement dans la régulation de l'expression d'IL-17RD induisant souvent sa surexpression¹⁰⁹⁻¹¹². La régulation d'IL-17RD par les miARNs est décrite dans la **section 1.2.2**. L'expression d'IL-17RD n'est cependant pas modulée par les hormones (androgènes) dans les cas de cancer de la prostate¹¹³.

1.1.3 Conclusion

La capacité du récepteur IL-17RD, membre de la famille des récepteurs à l'IL-17, à interagir avec d'autres récepteurs membranaires et certaines protéines cytoplasmiques ainsi que sa fonction potentielle de co-récepteur pour l'IL-17A lui confèrent potentiellement différents rôles et fonctions dans la cellule. Notamment dans les voies de signalisation FGF, IL-17, MAPKs et NF-κB impliquées dans des processus variés. Par conséquent, la modulation de son expression peut engendrer de nombreux dérèglements et des pathologies à l'instar du cancer, de l'auto-immunité et de l'inflammation chronique.

1.2 Un rôle controversé d'IL-17RD dans la carcinogénèse

Le cancer est une maladie complexe résultant du dysfonctionnement de gènes qui régulent normalement les processus cardinaux de la cellule, dont diverses fonctions nucléaires c.-à-d. la division cellulaire, la survie et les cascades de signalisation de la surface de la cellule au noyau. Les gènes associés au cancer sont généralement classés par types, (i) les **oncogènes** et (ii) les **gènes suppresseurs de tumeurs** (TSG) selon qu'ils favorisent ou répriment la tumorigénèse, respectivement. Les alternances génétiques jouent ainsi un rôle essentiel dans la pathogénèse de la maladie et fournissent des indices fondamentaux pour l'identification de cibles médicamenteuses et le développement de nouveaux médicaments.

1.2.1 IL-17RD : Un potentiel suppresseur de tumeur

Les gènes suppresseur de tumeur sont considérés comme un type crucial de gènes, impliqués dans la réparation du dommage à l'ADN, l'inhibition de la division cellulaire, l'induction de l'apoptose et la suppression des métastases. Par conséquent, la perte de fonction de ces gènes entraînent l'apparition et la progression d'un cancer¹¹⁴.

1.2.1.1 La perte d'expression d'IL-17RD dans les cancers

La perte d'expression d'IL-17RD est **commune à une variété de cancers solides humains** (sein, ovaire, prostate, thyroïde)¹¹⁵. Une étude du laboratoire a également montré qu'IL-17RD était sous-exprimé dans des lignées de cancers colorectaux (p. ex., HCT116, SW480, COLO205)¹⁰³. De manière intéressante, une association de la perte d'expression d'IL-17RD avec le **grade de la tumeur** a été observée. La diminution d'expression d'IL-17RD a été observée dans plusieurs biopsies de la prostate et corrèle avec l'agressivité des cellules tumorales¹¹³. De telles corrélations ont aussi été observées par des études transcriptomiques sur des tumeurs mammaires de différents grades¹¹⁶ et études immuno-histochimiques sur des tissus de l'épithélium de la prostate à différents stades du développement tumoral^{113,115,116}. Par conséquent, IL-17RD représenterait un gène suppresseur de tumeur potentiel, ce qui reste à démontrer.

1.2.1.2 IL-17RD, un inhibiteur des voies mitogéniques

Durant les premières années qui ont suivi sa découverte, IL-17RD a fait l'objet de plusieurs études afin d'élucider son rôle dans les voies mitogéniques, et plus particulièrement dans les voies des MAPKs. Typiquement, les cascades de **signalisation des MAPKs** sont composées de centaines de composantes qui régulent une grande diversité de fonctions physiologiques, de la prolifération à l'apoptose en passant par la réponse au stress et l'inflammation. La transmission du signal par ces cascades est généralement initiée par l'activation de petites protéines G (p. ex., Ras) ou par des interactions activatrices de composantes en amont de la cascade. Le signal est ensuite transmis en aval par des protéines kinases cytoplasmiques organisées en 3 à 5 niveaux (MAP4K, **MAPKKK**, **MAPKK**, **MAPK** and MAPKAPK). Les kinases de chaque niveau phosphorylent et activent les kinases du niveau suivant afin de permettre une transmission rapide et régulée des signaux via des cibles variées de la cascade. Les 3 cascades majeures complètement élucidées, nommées d'après la MAPK effectrice, sont (i) la cascade ERK1/2, (ii) la cascade JNK1-3 et (iii) la cascade des MAPKs p38 α , β , γ , δ (p38 α - δ). D'autres MAPKs atypiques ou composantes semblables aux MAPKs ont été identifiées (p. ex., ERK3/4 et ERK7/8), agissant par des mécanismes indépendants. Chaque cascade peut réguler plusieurs processus cellulaires, parfois distincts et qui parfois se chevauchent, et diffèrent généralement dans leurs activités physiologiques principales (**Figure 4.**).

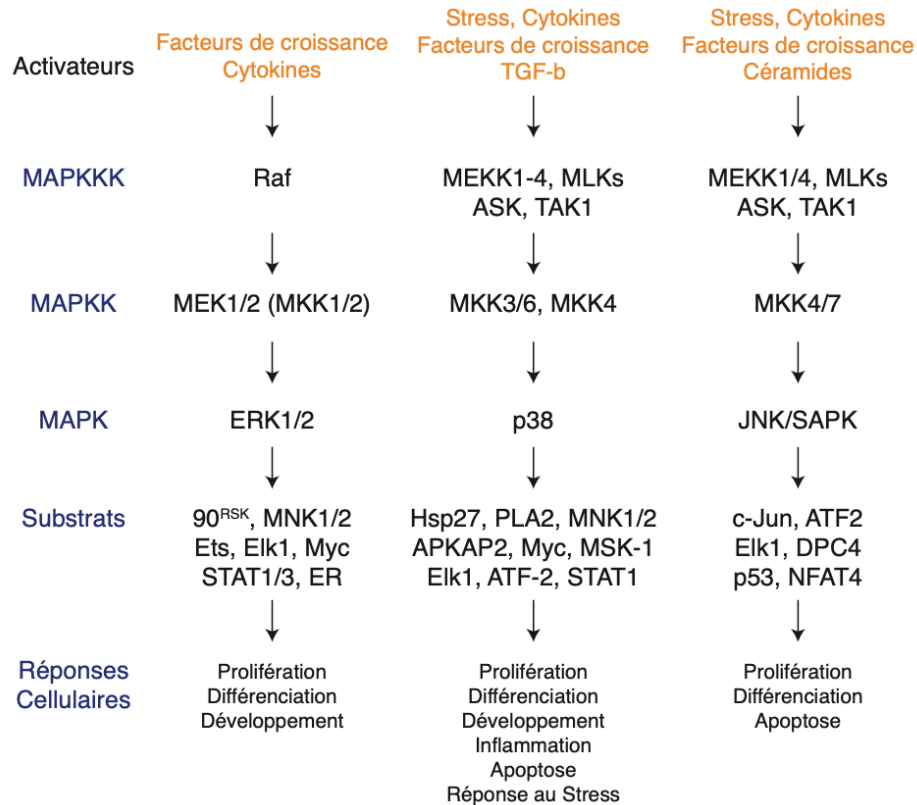


Figure 4. – Les cascades majeures des MAPK chez les mammifères. Les signalisations des MAPKs impliquant une série de cascades de protéines kinases jouent un rôle critique dans la régulation de la prolifération cellulaire. La stimulation de la protéine MAP kinase kinase kinase par divers activateurs spécifiques lui permet de phosphoryler ses MAP kinases kinases. Celles-ci phosphorylent à leur tour leurs MAP kinases associées qui activent une panoplie de substrats, agissant sur de nombreux processus cellulaires liés à la prolifération cellulaire. Adapté avec permission de Springer Nature : Cell Research (Zhang W and Liu HT) ¹¹⁷ © 2002

La **cascade ERK1/2** est activée par divers agents extracellulaires dont les facteurs de croissance, cytokines, hormones ou plus rarement par certaines conditions de stress pour induire l'expression de facteurs transcriptionnels impliqués dans des processus cellulaires tels que la prolifération et la différenciation¹¹⁸. Les facteurs extracellulaires agissent via des récepteurs tyrosine kinases (RTKs)¹¹⁹, des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)¹²⁰, ou certains canaux ioniques¹²¹. Brièvement, la liaison d'un facteur de croissance au récepteur induit sa dimérisation permettant ainsi son autophosphorylation. Le recrutement de protéines adaptatrices (GRB2, GEF, SOS) qui

s'ensuit permet l'activation de la protéine Ras qui recrute et active à son tour la protéine Raf à la membrane plasmique¹²². Le signal est ensuite transmis aux kinases MEK1/2¹²³ puis ERK1/2 dans le cytoplasme¹²⁴. Ces dernières sont en partie délocalisées au noyau pour permettre la phosphorylation de nombreux substrats (p. ex., RSK)¹²⁵ et facteurs de transcription (p. ex., Elk1)^{118,126}.

La **cascade de la MAPK p38** est activée principalement par le stress mais également par des processus tels que la réponse immune et l'inflammation via différents récepteurs tels que les récepteurs liés à l'apoptose, les GPCRs et les RTKs. Ayant quelques substrats en commun avec ERK1/2, p38 est ainsi impliquée dans la prolifération et la différenciation¹²⁷. De par certains autres substrats indépendants, p38 est aussi impliqué dans des processus d'inflammation, d'apoptose et de réponse au stress¹²⁸. Brièvement, le signal induit permet le recrutement d'un réseau complexe de molécules de signalisation qui activent à leur tour de petites GTPases (p. ex., Rac et CDC42) ou certaines protéines adaptatrices^{129,130}. Celles-ci activent un grand nombre de MAPKKKs¹³¹ qui activent principalement les MAPKKs MKK6 et MKK3^{132,133}. Ensuite, le signal est transmis aux produits de 4 gènes des MAPKs, p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . Les p38s peuvent être localisés au cytoplasme ou au noyau pour phosphoryler leurs nombreux substrats (p. ex., MNK1/2, MSK1/2) et facteurs de transcription (p. ex., Elk1)^{126,134}.

La **cascade JNK** joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose en réponse à diverses stimulations^{135,136}. Comme p38, cette cascade est induite par les récepteurs reliés au stress et à l'apoptose, les GPCRs et les RTKs ainsi que par les stress physiques indépendants de récepteurs. Malgré des similitudes prononcées et composantes partagées entre les cascades p38 et JNK, elles transmettent des signaux séparés et régulent des processus relativement distincts. Brièvement, les premières étapes sont similaires à la voie de signalisation p38¹³⁷ alors que certaines MAPKKK activées diffèrent pour activer à leur tour les kinases spécifiques de la voie JNK, MKK4 et MKK7¹³⁸. Ensuite, le signal est transmis aux produits de 3 gènes JNKs, JNK1-3¹³⁹. Contrairement à p38, les protéines JNKs sont des régulateurs majeurs de processus nucléaires de transcription.

Ainsi, après son activation, JNK migre rapidement au noyau où il peut physiquement s'associer et activer ses substrats (p. ex, c-Jun, ATF, Elk1)^{140,141}.

Dans ce contexte, notre compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels IL-17RD module la signalisation mitogénique repose sur deux observations, (i) IL-17RD interagit avec certains RTKs eux-mêmes et (ii) IL-17RD interagit avec certains composants en aval des récepteurs de certaines voies de signalisation des MAPKs.

1.2.1.2.1 Une régulation de certains récepteurs tyrosine kinase

Il existe 58 récepteurs tyrosine kinase chez l'homme qui sont répartis en 20 sous-familles. Parmi elles, il a été rapporté que 2 sont régulées par IL-17RD, (i) les récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR) et (ii) les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (ErbB ou EGFR).

IL-17RD a tout d'abord été identifié comme un **antagoniste de la signalisation des FGFR** médiée par la signalisation MAPK-Ras-Raf-MEK1/2 chez le poisson zèbre⁸⁹, ces observations ont ensuite été confirmées chez les mammifères. Chez les mammifères, la famille des FGF comprend 18 ligands qui exercent leur fonction à travers 4 récepteurs majeurs hautement conservés (FGFR1 à 4). Comme c'est le cas pour la plupart des RTKs¹⁴², la liaison du facteur de croissance FGF à son récepteur induit sa dimérisation suivie d'un changement conformationnel de sa structure nécessaire à l'activation du domaine kinase intracellulaire. Brièvement, la transphosphorylation de résidus tyrosines de ce domaine révèle un site d'ancrage pour une cascade de protéines adaptatrices (p. ex. FRS2, GRB2 et SOS) qui activent Ras et la signalisation des MAPK-ERK1/2 en aval¹⁴³. Indépendamment, le recrutement de la protéine adaptatrice GRB2 permet également la génération d'un nouveau complexe pour activer une signalisation anti-apoptotique dépendante de AKT¹⁴⁴. Finalement, la phosphorylation de FGFR active la phospholipase C γ (PLC γ) capable d'activer elle-même la protéine kinase C (PKC) renforçant ainsi la signalisation des MAPK en phosphorylant Raf (**Figure 5**).

La signalisation FGF est sujette à être atténuée par un contrôle de **rétroaction négatif** encore peu connu. Cependant, certains mécanismes ont été identifiés,

notamment la signalisation MAPK hautement régulée utilise **ERK1 et ERK2** afin de phosphoryler des résidus sérine et/ou thréonine sur FRS2 inhibant le recrutement de GRB2. Des **phosphatases des MAPK** (MKP) sont aussi recrutées pour atténuer la signalisation en aval¹⁴⁵. De plus, les membres de la famille des **protéines Sprouty** (SPRY) entrent en compétition avec SOS pour la liaison à GRB2 empêchant l'activation de Ras ou encore se lieent directement à Raf et bloquent la signalisation en aval^{146,147}. De la même façon, les premiers travaux sur IL-17RD ont rapporté un rôle de modulateur de la signalisation FGF. En effet, **IL-17RD** est capable d'interagir avec FGFR1 et FGFR2 pour inhiber les signalisations AKT et MAPK-ERK1/2⁹⁶. Son interaction avec FGFR1 permettrait une inhibition de la phosphorylation du récepteur⁹⁰ et donc des signalisations en aval médiées par FGF2/8^{89,91-93}. De plus, d'un point de vue structurel, il a été démontré que le domaine extracellulaire permet de potentialiser l'inhibition de la signalisation alors que le domaine intracellulaire est lui-même nécessaire pour cette interaction et inhibition⁹⁹. En outre, la phosphorylation du résidu Tyrosine 330 d'IL-17RD lui permettrait une localisation préférentielle à la membrane et augmenterait son pouvoir inhibiteur sur la signalisation FGF¹⁴⁸.

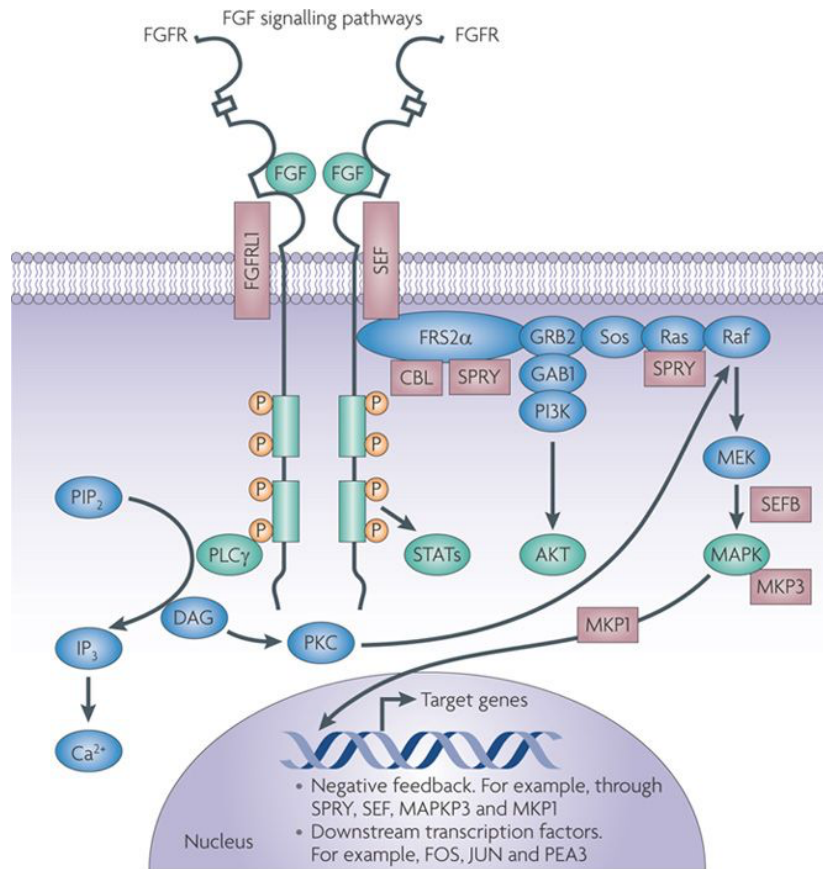


Figure 5. – Le réseau de signalisation FGFR. Le réseau de transduction du signal en aval des récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFRs) et ses régulateurs négatifs. Suite à la liaison du ligand et la dimérisation du récepteur les domaines kinase se trans-phosphorylent, menant à un amarrage des protéines adaptatrices et une activation de quatre voies clés en aval: Ras-Raf-MAPK, PI3K-AKT, STAT et phospholypase C γ (PLC γ)¹⁴⁹. Les récepteurs FGFRs ont aussi été démontrés comme se liant et phosphorylant directement la kinase ribosomale S6. La signalisation peut être régulée négativement à différents niveaux par l'internalisation du récepteur ou l'induction de régulateurs négatifs, incluant FGFR-like 1 (FGFRL1), SEF, Sprouty (SPRY), CBL, MAPK phosphatase 1 (MPK1) et MPK3 (marron). Ces régulateurs peuvent moduler la liaison du ligand (FGFRL1 et SEF) ou interférer avec la signalisation intracellulaire, principalement en modulant la signalisation MAPK. Abréviations: DAG, diacylglycérol; FRS2a, substrat de FGFR 2a; GRB2, facteur de croissance lié au récepteur 2; IP₃, inositol triphosphate; P, phosphorylation; PIP₂, phosphatidylinositol-4,5-biphosphate; PKC, protéine kinase C; Sos, « son of sevenless ». Adapté de Springer Nature : Nature Reviews Cancer (Turner N and Grose R)¹⁵⁰. 2010

Parallèlement, une étude du rôle d'IL-17RD sur la signalisation des **récepteurs ErbB ou EGFR** suggère un **rôle positif** sur la voie des MAPK médiée par EGFR.

Capable d'interagir avec EGFR, IL-17RD atténue la dégradation du récepteur et potentialise sa circulation dans la cellule permettant ainsi une augmentation de la phosphorylation du substrat ERK1/2 et la différenciation de cellules de phéochromocytome de rat (PC12)¹⁰⁰.

1.2.1.2.2 Une régulation des voies des MAPKs en aval des RTKs et/ou induites par d'autres récepteurs

Plusieurs études indiquent que les deux isoformes d'IL-17RD jouent également un rôle important dans la régulation des MAPK en aval des RTKs, cependant le mécanisme précis par lequel ils agissent est controversé.

Alors que deux études suggèrent une interaction de hll17rd-a avec **Ras** pour en modifier son activation^{92,104}, d'autres placent hll17rd-a et/ou hll17rd-b au **niveau de MEK**. Dans ce dernier cas, certains groupes affirment qu'IL-17RD inhiberait la phosphorylation de MEK/ERK^{91,93,97} alors que d'autres études suggèrent qu'IL-17RD empêcherait la dissociation de MEK/ERK bloquant la translocation nucléaire de ERK1/2 nécessaire à ses fonctions^{95,102,103,151}. Certaines contradictions dans ces études sont attribuées aux différences de conditions expérimentales et ne permettent pas encore d'établir un mécanisme commun et unifié expliquant l'inhibition de la voie MAPK/ERK1/2 en aval des RTKs.

Parallèlement, IL-17RD interagit avec **TAK1** pour induire les signalisations TAK1-MKK4-JNK et p38 et mener à l'apoptose^{108,152}.

1.2.1.3 IL-17RD et les voies mitogéniques: des conséquences biologiques pour la cellule

La plupart des membres des RTKs ont été identifiés comme étant des régulateurs de processus cellulaires critiques, tels que la **prolifération** et **différenciation**, la **survie** et le **métabolisme**, la **migration** et le **contrôle du cycle cellulaire**^{142,153,154}. Des mutations et activations aberrantes des RTK et des voies de signalisation intracellulaires associées sont ainsi liées à des formes de cancers, au diabète, à l'inflammation, des

maladies des os, artériosclérose et l'angiogenèse. Les mécanismes oncogéniques de la signalisation FGF, plus spécifiquement, sont liés à son rôle dans la prolifération, la survie, la migration et invasion ainsi que l'angiogenèse.

Quels que soient les mécanismes de régulation impliqués, globalement, IL-17RD est décrit comme un inhibiteur de la voie MAPK-ERK1/2 et représente un frein nécessaire à leur régulation. C'est dans ce contexte qu'il a été proposé que IL-17RD pourrait jouer un rôle suppresseur de tumeur. Dans ce sens, plusieurs études font état de l'impact de l'expression d'IL-17RD sur des réponses physiologiques associées aux voies de signalisation altérées. D'autres, permettent d'établir un lien plus clair entre IL-17RD et la pathologie du cancer.

1.2.1.3.1 Un impact sur la prolifération et la survie

Physiologiquement, il a été rapporté que la surexpression d'IL-17RD atténue la **prolifération** induite par FGF dans les NIH3T3^{90,91,95,97,155}. Deuxièmement, la surexpression d'IL-17RD diminue la viabilité cellulaire dans les HUVEC⁹⁹ et induit l'**apoptose** dans les NIH3T3⁹⁷. Troisièmement, IL-17RD réprime la **formation de colonies** dans des lignées cellulaires de cancer du sein (p. ex., MDA-MB-435)¹¹⁵ et les NIH3T3⁹¹. Finalement, dans les cancers colorectaux, la perte d'expression d'IL-17RD observée permet la délocalisation accrue de ERK1/2 au noyau et augmente la prolifération des cellules épithéliales alors que sa surexpression restaure leur prolifération et inhibe la croissance tumorale chez la souris¹⁰³.

Indépendamment, l'effet activateur d'IL-17RD sur les voies JNK et p38 induit l'**apoptose** *in vitro*. En effet, la surexpression d'IL-17RD augmente la formation de Caspase 3 clivée¹⁰⁶ et la quantité de cellules en apoptose mesurée par un marquage à l'Annexine V dans les HEK293T^{108,152}.

1.2.1.3.2 Un impact sur la migration et l'invasion

Un rôle d'IL-17RD a été démontré sur la migration et l'invasion dans le cancer de la prostate via une diminution d'expression de certains enzymes responsables de la

dégradation des composants de la matrice extracellulaire tel que la **métalloprotéase MMP9**¹¹³. De plus, des travaux plus récents démontrent qu'IL-17RD inhibe la **transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)** dans le cancer du sein et de la prostate^{156,157}. En effet, dans les cellules cancéreuses du sein, IL-17RD régule négativement l'EMT dépendamment de la β -caténine¹⁵⁶ alors que dans les cellules cancéreuses de la prostate, IL-17RD inhibe l'EMT, le processus métastatique et les voies de signalisation associées telles que ERK1/2, p38 et JNK¹⁵⁷.

1.2.1.3.3 IL-17RD, un potentiel thérapeutique futur?

L'implication d'IL-17RD dans les cancers présente un intérêt pour son utilisation en thérapeutique. Ainsi, une étude a été menée afin de déterminer le potentiel thérapeutique du gène codant pour hll17rd-b **livré par ultrason** dans des tumeurs de prostate. Hll17rd-b a été capable d'**inhiber l'angiogenèse et la croissance tumorale** *in vivo*¹⁵⁸. Paradoxalement aux observations avancées ci-dessus, un autre intérêt thérapeutique a été identifié pour IL-17RD puisque sa perte d'expression confère potentiellement une **résistance aux inhibiteurs de MEK**. En effet, l'équipe du Dr. Don L. Gibbons démontre que dans des lignées de cancer du poumon, IL-17RD induit la signalisation Ras/MEK/ERK1/2 et sensibilise ainsi les cellules aux inhibiteurs connus de MEK¹⁵⁹.

Parce que les fonctions (le plus souvent) inhibitrices d'IL-17RD agissent sur des processus physiologiques liés au cancer, un rôle suppresseur de tumeur d'IL-17RD est fortement suggéré. Toutefois, quelques contradictions dans son activité viennent défier cette hypothèse et aucune étude *in vivo* n'a été utilisée afin de la confirmer. De plus, de nouvelles évidences sur l'impact de nouveaux régulateurs de l'expression d'IL-17RD, les micro-ARNs viennent renforcer cette controverse.

1.2.2 Une régulation de l'expression d'IL-17RD par les micro-ARN: Quelques cas d'induction de cancers

1.2.2.1 L'interférence par ARN

Les **ARNs interférents ou silencieux** sont de petits ARNs retrouvés chez les animaux, les plantes et les champignons (p. ex., siARN, piARN, miARN). Les micro-ARNs (miARNs) sont des ARNs endogènes de ~23 nt qui dérivent de transcrits ayant la particularité de se replier sur eux-mêmes pour former une structure en épingle caractéristique (Bartel. 2004). Les miARNs jouent un rôle important dans la régulation des gènes chez les animaux et les plantes. Ils sculptent l'expression des ARNm de gènes codants pour des protéines en s'appariant à leur **région 3'UTR**, réprimant ainsi leur expression post-transcriptionnelle¹⁶⁰. En effet, de manière générale, les miARNs de metazoaires dirigent une répression traductionnelle, une déstabilisation de l'ARNm, ou une combinaison des deux¹⁶¹⁻¹⁶³. Le nombre de miARNs identifiés est estimé à 2000 chez l'homme et régulent un tiers du génome humain¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

1.2.2.2 Une surexpression d'IL-17RD aux conséquences inattendues

Dans ce contexte, des travaux récents ont identifié IL-17RD comme une cible de plusieurs miARNs. De manière surprenante et contradictoire par rapport à la partie précédente, dans les cas de cancers recensés, les miRNAs sont eux-mêmes régulés à la baisse, induisant une surexpression d'IL-17RD et une induction de la carcinogénèse. IL-17RD se comporte ainsi comme un **oncogène** dans la plupart de ces études. Il est important de souligner cependant que les miARNs peuvent moduler plusieurs gènes cibles et qu'il est difficile d'isoler l'effet d'un miARN à un seul gène. Ces études ont donc une valeur limitée et doivent être interprétées avec prudence.

1.2.2.2.1 *MiR-193a-3p et le cancer colorectal*

Une analyse de miRNA array sur tissus de patients atteints de colite ulcéreuse sans (n=9) et avec néoplasie (n=11) identifie miR-193a-3p comme significativement

sous-exprimé dans les tissus de patients atteints de colite ulcéreuse avec néoplasie. IL-17RD, une cible prédite de ce miRNA est lui-même surexprimé dans les tissus de la cohorte de patients atteints de colite ulcéreuse avec néoplasie comparé à une cohorte contrôle de patients sains (n=12). Une corrélation est établie entre la perte d'expression du miRNA et la surexpression d'IL-17RD. Dans ce contexte, les auteurs proposent un rôle oncogénique d'IL-17RD dans le cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse^{109,167}. De plus, plus récemment, une étude indépendante introduit un nouvel acteur dans cette régulation, un ARN long non codant LncRNA NEAT1 entrerait en compétition avec miR-193a-3p et empêcherait indirectement la régulation à la baisse d'IL-17RD¹¹⁰.

1.2.2.2.2 MiR-518a-5p et les gliomes/glioblastomes

Deux études concomitantes identifient un ARN interférent circulaire circ-PITX1 dans les tumeurs primitives du cerveau, les gliomes et glioblastomes qui régulerait indirectement IL-17RD à la hausse via la régulation du miR-518-5p lui conférant un rôle pro-tumorigénique^{111,112}.

1.2.2.2.3 MiR-506 et le carcinome papillaire de la thyroïde

Une étude identifie une baisse d'expression de miR-506 dans des tissus de patients atteints de carcinome papillaire de la thyroïde (PTC) ainsi qu'une augmentation de l'expression de ses gènes cibles dont IL-17RD. L'axe miR-506/IL-17RD est ensuite démontré comme étant responsable de l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'invasion et la migration¹⁶⁸.

1.2.3 Conclusion

L'implication d'IL-17RD dans les voies de signalisation mitogéniques penchent depuis des années vers un potentiel rôle suppresseur de tumeur d'IL-17RD même si certaines études viennent défier cette hypothèse. Indépendamment, de nombreux interacteurs additionnels, appartenant notamment aux voies de signalisation IL-17 et NF- κ B lui confèrent également un rôle dans l'inflammation.

1.3 IL-17RD : Un régulateur de l'inflammation par une modulation de l'immunité innée

L'inflammation, telle qu'énoncée en latin, a été définie au premier siècle ap J.-C et se référait aux symptômes cliniques observés, regroupant la chaleur (*calor*), douleur (*dolor*), rougeur (*rubor*) et tuméfaction (*tumor*). Après deux millénaires de science et de médecine, nos connaissances se sont étendues au-delà de cette définition.

En effet, nous savons maintenant que les vertébrés sont constamment menacés par l'invasion de microorganismes et ont des systèmes immuns de défense évolués pour éliminer les pathogènes infectieux. **L'immunité innée**, développée plus extensivement dans cette section, est la première ligne de défense de l'hôte contre les pathogènes. **L'immunité adaptative** (brièvement décrite **section 1.3.2**), est impliquée dans l'élimination des pathogènes dans la réponse tardive de l'infection ainsi que dans l'établissement d'une mémoire immunologique. Des dérèglements dans le compartiment de la réponse immunitaire innée peuvent mener à de graves conséquences, notamment à un état d'inflammation incontrôlée menant à des maladies auto-immunes et autres pathologies.

1.3.1 Le système immunitaire inné, première réponse aux pathogènes

Présent chez les plantes, invertébrés et vertébrés, le système immunitaire inné repose sur la reconnaissance d'un type de molécules particulier, les **motifs moléculaires associés aux pathogènes** ou « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMPs) commun à de nombreux pathogènes mais absent chez l'hôte, par des récepteurs invariants, les **récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires** ou « Pattern Recognition Receptors » (PRRs)¹⁶⁹. La reconnaissance de ces PAMPs par un PRR est suffisante pour libérer la réponse immune innée de l'hôte, qui à son tour promeut une élimination rapide de cette menace extérieure par (i) la destruction du pathogène par phagocytose (via les macrophages et cellules dendritiques) ou par dégranulation (via les eosénohiles), (ii) la libération de cytokines pro-inflammatoires et le remodelage de la matrice extracellulaire pour faciliter le recrutement de cellules immunitaires additionnelles

(p. ex., neutrophiles), et (iii) opsonisation du pathogène, voire lyse de celui-ci, par la voie du complément.

Différents PRRs réagissent à des PAMPs spécifiques, ont des profils d'expression distincts, activent des voies de signalisation spécifiques, et mènent à des réponses anti-pathogènes distinctes. Les **récepteurs membranaires TLRs** sont les mieux caractérisés, les **récepteurs cytoplasmiques** moins caractérisés complètent cependant cette reconnaissance partielle des PAMPs.

1.3.1.1 Les PRRs membranaires : Récepteurs de type Toll

La machinerie de base nécessaire à la reconnaissance de pathogènes par l'immunité innée est très conservée entre les espèces, des plantes et drosophiles aux mammifères. Par conséquent, les études des mécanismes utilisés par les insectes pour reconnaître et combattre les infections ont été critiques pour la découverte des fonctions immunitaires des TLRs. En effet, des études génétiques chez *Drosophila melanogaster* ont mené à la découverte de la **protéine Toll** siégeant en amont des facteurs qui entraînent la réponse antimicrobienne. De plus, l'identification de la famille des facteurs de transcription NF- κ B comme régulateur de la réponse antimicrobienne chez *Drosophila* a conduit à suggérer que des voies similaires opéraient chez les mammifères^{170,171}. Ainsi, l'homologue humain de la protéine Toll chez *Drosophila* (appelé TLR4) a été identifié comme un récepteur capable de mener des réponses qui promeuvent l'inflammation et l'immunité adaptative¹⁷². Le stimuli activant **TLR4** étant le **lipopolysaccharide bactérien (LPS)**¹⁷³.

Les TLRs, premiers déterminants de l'activation immune, font partie d'une petite famille de récepteurs, 10 récepteurs distincts chez l'humain et 12 chez la souris. Les PAMPs, selon leur nature induisent une activation des TLRs présents à des compartiments cellulaires distincts. Ainsi certains TLRs, **localisés à la membrane plasmique**, détectent les composants microbiens à la surface de la cellule; alors que d'autres, **localisés aux endosomes** détectent les acides nucléiques. En effet, des évidences génétiques chez la souris ont démontré qu'à la membrane, TLR4 reconnaît le

LPS¹⁷³, TLR5 reconnaît la flagelline¹⁷⁴ et TLR1, 2 et 6 les lipoprotéines bactériennes¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Aux endosomes, TLR3 reconnaît l'ARN double brin (ARNdb)¹⁷⁸, TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin (ARNsb)¹⁷⁹, alors que TLR9 reconnaît l'ADNsb contenant des CpG non méthylés¹⁸⁰ et TLR13 reconnaît l'ARN bactérien ribosomal¹⁸¹ (**Figure 6.**). Certains ligands de TRL chez les mammifères restent encore non définis (i.e. TLR10 chez l'humain).

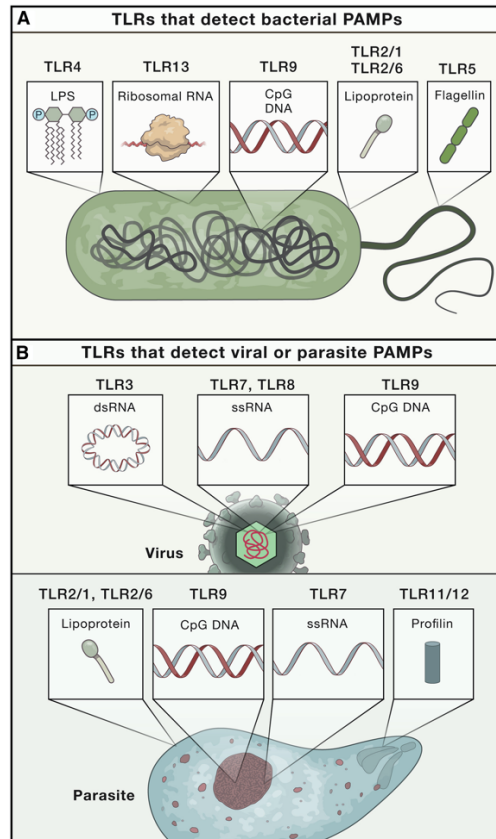


Figure 6. – Plusieurs membres de la famille des TLRs peuvent détecter des PAMPs sur des microorganismes indépendants. Une bactérie (A), un virus, ou un parasite (B) sont représentés. Les inserts affichent les PAMPs et TLRs responsables de leur détection. Les noms des TLRs représentent ceux connus chez la souris, puisqu’une évidence génétique est disponible pour soutenir l’importance de chaque interaction TLR-PAMP indiquée. Adapté avec permission de Springer Nature : Cell (Fitzgerald KA and Kagan JC)¹⁸² © 2020

Les TLRs sont exprimés sur une **variété de cellules immunitaires**, dont les macrophages, les cellules dendritiques (DCs), les cellules B, certains types spécifiques

de cellules T, et même des cellules non immunitaires tels que les **fibroblastes** et les **cellules épithéliales** (notamment à la frontière avec l'environnement extérieur, comme les cellules épithéliales de l'intestin).

Les TLRs activent les mêmes molécules de signalisation utilisées par la signalisation IL-1R¹⁸³. Elle est initiée par la dimérisation des ectodomains extracellulaires médiée par les PAMPs qui est un phénomène fondamental du processus de signalisation puisqu'il résulte en la dimérisation des domaines cytoplasmiques homologues aux récepteurs à l'interleukine 1 (IL-1R), appelés **domaines d'homologie Toll/IL-1R (TIR)**^{184,185}. Depuis ces domaines, des signalisations différentielles sont induites par les différents ligands via le recrutement sélectif de différentes molécules adaptatrices. Le facteur de différenciation des myéloïdes 88 (MyD88) et la protéine adaptatrice induisant IFN- β contenant un domaine TIR (TRIF) sont responsables de l'activation de voies de signalisation distinctes, menant à la production de (i) **cytokines pro-inflammatoires** et (ii) **IFNs de type I**, respectivement (**Figure 7.**).

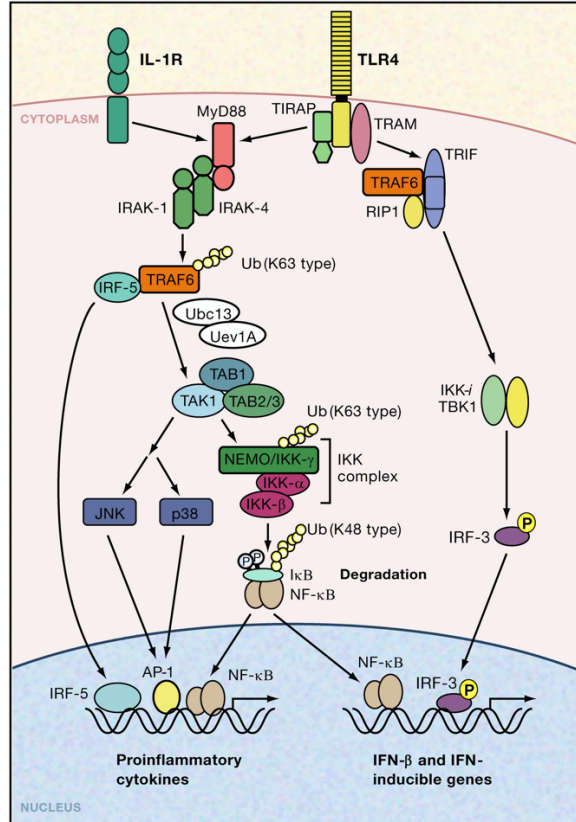


Figure 7. – La voie de signalisation TLR. Les TLRs et IL-1R partagent généralement des signalisations communes. Une stimulation par leur ligand recrute des adaptateurs contenant des domaines TIR dont MyD88 et TIRAP au récepteur, et la formation subséquente du complexe des IRAKs, TRAF6, et IRF-5 est induite. TRAF6 agit comme une E3 ubiquitine ligase et catalyse la chaîne de polyubiquitination liée à K63 sur TRAF6 lui-même et NEMO avec le complexe E2 ubiquitine ligase de UBC13 et UEV1A. Cette ubiquitination active le complexe TAK1, résultant en la phosphorylation de NEMO et l'activation du complexe IKK. IκB phosphorylé subit une ubiquitination liée à K48 et une dégradation par le protéasome. NF-κB libéré se déplace au noyau et initie l'expression de gènes de cytokines proinflammatoires. Simultanément, TAK1 active les cascades des MAP kinases, menant à l'activation de AP-1, qui est aussi critique pour l'induction de gènes de cytokines. TLR4 déclenche la signalisation indépendante de Myd88 mais dépendante de TRIF via TRAM pour induire les IFNs de type I. TRIF active NF-κB et IRF-3, résultant en l'induction de gènes de cytokines proinflammatoires et des IFNs de type I. TRAF6 et RIP1 induisent l'activation de NF-κB et TBK1/IKK-*i* phosphoryle IRF-3, qui à son tour induit la translocation de IRF-3. Adapté avec permission de Springer Nature : Cell (Akira S, Uematsu S and Takeuchi O)¹⁶⁹ © 2006

L'activation des récepteurs TLRs et leurs signalisations respectives induisent des changements de nombreuses activités cellulaires telles que la transcription de certains

gènes, l'épissage, l'efficacité de traduction, l'autophagie, la glycolyse, et la phosphorylation oxydative¹⁸².

1.3.1.2 Les PRRs cytoplasmiques

Les TLRs reconnaissent les pathogènes à la surface cellulaire ou aux membranes d'endosomes/lysosomes, suggérant que le système TLR n'est pas utilisé pour la détection de pathogènes qui ont **envahi le cytosol**. Ces pathogènes sont détectés par une variété de PRRs cytoplasmiques. Actuellement, ils sont grossièrement classés en deux groupes, les **récepteurs de type NOD (NLR)** et les **récepteurs de type RIG (RLR)** impliqués dans la reconnaissance de composants bactériens ou viraux, respectivement.

1.3.1.2.1 Les récepteurs cytoplasmiques antibactériens : NLRs

Les protéines NLRs sont impliquées dans la reconnaissance de **composants bactériens**. Ces protéines possèdent les domaines de répétition de motifs riches en leucines (LRRs) qui permettent la détection du ligand; un domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides¹⁸⁶; et un domaine nécessaire à l'initiation de la signalisation tels que les domaines CARDs, PYRIN ou BIR. NOD1 et NOD2 sont les membres de la famille des NLRs les plus étudiés. Ils permettent la détection de l'acide γ -D-glutamyl-meso-diaminopimélique (γ -DAP) et le dipeptide muramyl (MDP) présents chez les bactéries Gram positives^{187,188}. La liaison du ligand à NOD1 et NOD2 induit leur oligomérisation et résulte en une activation de la **voie NF- κ B** par le recrutement d'une sérine/thréonine kinase aux NODs via leurs domaines CARDs. En outre, une infection bactérienne induit l'activation de la caspase-1 qui catalyse la transformation de pro-IL-1 β pour produire la cytokine mature via un complexe de protéine, l'**inflammasome**¹⁸⁹.

1.3.1.2.2 Les récepteurs cytoplasmiques antiviraux : RLRs

Les ARNs double brins synthétisés dans le cytoplasme de la cellule ou présents dans le génome viral libéré dans la cellule ne sont pas accessibles au TLR3, le TLR qui reconnaît l'ARNdb. Par conséquent, un type supplémentaire de récepteur

cytoplasmique est nécessaire à cette reconnaissance. La description des Retinoic-acid-inducible protein I (RIG-I) et leurs signalisations est précisée dans le **Chapitre 3** en introduction au **Chapitre 4**.

1.3.2 Le système immunitaire adaptatif, pour une réponse plus tardive et ciblée

La réponse précoce du système inné qui dépend de PRRs invariants reconnaissant des caractéristiques communes des pathogènes est cruciale, cependant elle est surmontée par un grand nombre de pathogènes et n'induit pas de mémoire immunologique. Elle contribue cependant à l'établissement de la réponse immunitaire adaptative qui a une capacité à reconnaître tous les pathogènes de manière **spécifique** et à fournir une **protection accrue** contre les surinfections. Celle-ci est basée sur une **sélection clonale de lymphocytes** comprenant des récepteurs spécifiques d'antigènes.

1.3.3 IL-17RD et l'inflammation

1.3.3.1 Les voies de l'inflammation modulées par IL-17RD

1.3.3.1.1 La signalisation NF- κ B induite par IL-17

L'appartenance d'IL-17RD à la famille des récepteurs à l'IL-17 en fait un candidat idéal comme potentiel modulateur de cette signalisation. Cependant, l'impact d'IL-17RD sur la signalisation IL-17 demeure peu étudié et actuellement controversé. En effet, IL-17RD est considéré selon les circonstances comme (i) un **médiateur** de la signalisation NF- κ B induite par IL-17, ou (ii) un **inhibiteur** de la signalisation NF- κ B induite par IL-17.

Typiquement, la signalisation IL-17 nécessite l'hétérodimérisation des récepteurs IL-17RA et IL-17RC suivie du recrutement de la protéine adaptatrice Act-1 via leurs domaines SEFIR respectifs. TRAF6 est à son tour recruté et activé afin d'induire la signalisation NF- κ B et celle des MAPKs. Ainsi, d'un côté, il a été rapporté qu'IL-17RD est capable d'interagir via son domaine intracellulaire avec le récepteur IL-17RA et TRAF6 permettant ainsi d'**induire la signalisation IL-17** dans la lignée cellulaire HEK293T et

les fibroblastes embryonnaires murins (MEFs)⁹⁸. De plus, une étude plus récente confirme l'interaction d'IL-17RD avec IL-17RA. Dans cette étude, IL-17RD serait un récepteur alternatif pour IL-17A dans les kératinocytes, induisant la signalisation IL-17 et lui conférant un rôle *in vivo* dans les maladies d'inflammation de la peau tel que le psoriasis^{23,190}.

Contradictoirement, IL-17RD est également un **régulateur négatif de la voie NF- κ B** induite par IL-17 et inhibe ainsi l'expression des gènes pro-inflammatoires cibles associés. Il a été rapporté qu'IL-17RD coordonne ces effets inhibiteurs en régulant négativement la liaison Act-1/TRAF6 et en perturbant l'axe IL-17RA/Act-1/TRAF6 dans différentes lignées cellulaires telles que les MEFs et les cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMCs) mais aussi dans les tissus de poumon¹⁹¹. Conjointement, IL-17RD promeut l'activation des MAPK p38 induite par IL-17 et l'induction de gènes associés tels que MIP-2¹⁹¹.

1.3.3.1.2 La signalisation NF- κ B induite par IL-1R/TLR

IL-17RD a aussi été caractérisée comme un **inhibiteur de la signalisation NF- κ B induite par IL1-R et les TLRs** à différents niveaux, (i) en aval du récepteur IL1-R par séquestration de NF- κ B au cytoplasme et (ii) au complexe intracellulaire du récepteur TLR par une interaction SEFIR/TIR avec les protéines adaptatrices.

D'abord, l'équipe du Dr. Dina Ron a mis en évidence l'inhibition de la voie NF- κ B induite par IL-1. Dans cette étude, IL-17RD agit en tant que protéine de séquestration pour NF- κ B en interagissant avec la sous-unité p50 de la voie canonique de NF- κ B et empêchant sa translocation nucléaire et la transcription de gènes cibles associés^{105,106}.

Parallèlement, l'équipe du Dr. Paul N. Moynagh identifie IL-17RD comme un régulateur négatif de la signalisation TLR via une interaction SEFIR/TIR entre le domaine SEFIR d'IL-17RD et le domaine TIR de la protéine adaptatrice MyD88¹⁰⁷.

1.3.3.2 Les conséquences biologiques induites par l'expression d'IL-17RD sur l'inflammation

De par l'implication d'IL-17 dans certaines pathologies telles que des maladies auto-immunes et l'implication des voies IL-1/TLR dans la réponse pro-inflammatoire antimicrobienne, il est possible de spéculer l'impact d'une dérégulation de ces voies lors d'une réponse inflammatoire accrue. Cependant, très peu d'études *in vivo* ont été menées pour caractériser son impact dans ces processus.

Malgré son rôle controversé dans la signalisation IL-17, il a été rapporté qu'IL-17RD régule l'**infiltration de neutrophiles** induite par IL-17A dans les tissus du poumon *in vivo* via l'induction de l'expression du gène MIP-2¹⁹¹. De plus, IL-17RD est requis pour l'induction de la **maladie d'inflammation de la peau** de type psoriasis induite par l'imiquimod (IMQ) via une activation de la voie IL-17^{23,190}.

Parallèlement, son étude dans la signalisation TLR a permis d'établir que les souris *Il17rd^{-/-}* sont plus sensibles à la **mortalité induite par le LPS ou le poly(I :C)**¹⁰⁷.

1.3.4 Conclusion

L'implication d'IL-17RD dans les voies de signalisation liées à l'inflammation lui confère un rôle controversé *in vitro* en tant qu'inhibiteur ou activateur de la voie IL-17 alors que son rôle d'inhibiteur des TLRs semble plus certain. Les études menées *in vivo* lui confèrent un rôle dans l'induction de maladies d'inflammation chroniques telles que le psoriasis et un rôle protecteur contre les infections aiguës au LPS et poly(I :C).

L'inflammation chronique étant considérée comme un trait caractéristique des tumeurs, elle fait maintenant partie intégrante de la nouvelle génération des fameux « Hallmarks of cancer » décrits par Douglas Hanahan et Robert A Weinberg. Il semble donc intéressant d'en comprendre et décrire les mécanismes connus afin d'étudier IL-17RD dans ce contexte spécifique.

Partie B : De l'inflammation au cancer

1.4 L'inflammation chronique: Un environnement propice au développement tumoral

La présence de leucocytes au sein de tumeurs, observée au 19^{ème} siècle par Rudolf Ludwig Karl Virchow, a fourni les premières indications d'un lien possible entre l'inflammation et le cancer¹⁹². Pourtant, ce n'est que cette dernière décennie que des évidences claires ont montré que l'inflammation joue un rôle essentiel dans la tumorigénèse.

1.4.1 De l'inflammation au cancer

Le rôle de l'inflammation dans la tumorigénèse est maintenant accepté et l'environnement tumoral est devenu un trait caractéristique des tumeurs¹⁹³. Les sources d'inflammation sont multiples et s'étendent d'infections microbiennes et virales à l'exposition à des allergènes et produits chimiques toxiques aux maladies auto-immunes et l'obésité. Une **réponse inflammatoire accrue** est le plus souvent bénéfique, en particulier en réponse à une infection ou un dommage tissulaire et une réponse inflammatoire bien régulée peut également avoir des propriétés anti-tumorales¹⁹⁴, cependant une **inflammation chronique** est préjudiciable et prédispose fréquemment les cellules à l'initiation ou la progression tumorale.

1.4.1.1 Les types d'inflammation associés au cancer

Plusieurs types d'inflammation peuvent promouvoir le développement et la progression du cancer. Parmi eux, on compte (i) l'inflammation chronique induite par les infections microbiennes, virales ou par les dérégulations immunitaires et l'auto-immunité, (ii) l'inflammation chronique induite par les expositions environnementales, (iii) le microenvironnement tumoral et (iv) l'inflammation induite par les thérapies (**Figure 8.**).

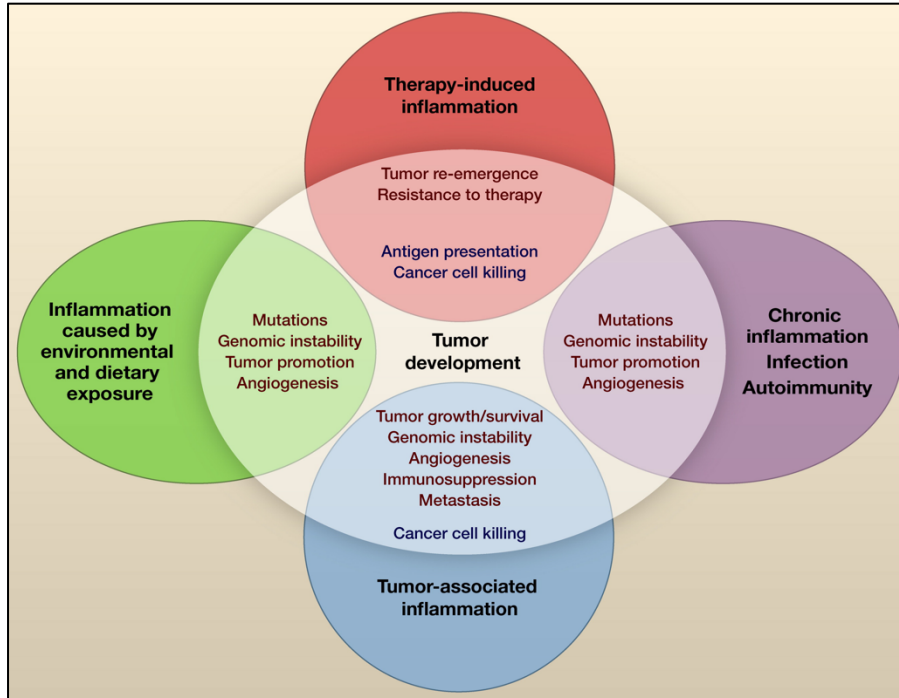


Figure 8. – Les types d’inflammation associés à la tumorigénèse et au cancer.

L'inflammation chronique associée aux infections ou aux maladies auto-immunes précède le développement tumoral et peut y contribuer par l'induction de mutations oncogéniques, d'instabilité génomique, de promotion tumorale précoce, et d'angiogénèse accrue. Une exposition prolongée à des irritants environnementaux ou l'obésité peuvent aussi résulter en une inflammation chronique de bas grade qui précède le développement tumoral et y contribue par les mécanismes mentionnés ci-dessus. L'inflammation associée aux tumeurs va de concert avec le développement tumoral. Cette réponse inflammatoire peut accroître la néo-angiogénèse, promouvoir la progression tumorale et la dissémination métastatique, causer une immunosuppression locale, et augmenter l'instabilité génomique. Les thérapies du cancer peuvent aussi déclencher une réponse inflammatoire causant un trauma, de la nécrose, et des lésions tissulaires qui stimulent la réémergence tumorale et la résistance aux thérapies. Cependant, dans certains cas, l'inflammation induite par les thérapies peut augmenter la présentation d'antigènes menant à une éradication des tumeurs médiée par l'immunité. Les mécanismes favorisant le développement tumoral sont en rouge les mécanismes anti-tumoraux sont en vert. Adapté avec permission de Springer Nature : Cell (Grivennikov SI, Greten FR and Karin M)¹⁹⁵ © 2010.

Premièrement, il est maintenant bien établi qu'une induction d'inflammation par les **bactéries** et par des **infections virales** augmente le risque de cancer¹⁹⁶. Ainsi, une inflammation chronique induite par une infection persistante à *Helicobacter pylori* est

associée à des cancers gastriques, alors que d'autres infections aux bactéries commensales (p. ex. *Bactéroïdes fragilis*) sont liées au cancer colorectal¹⁹⁷. De plus, des infections aux virus de l'Hépatite B (HBV) ou C (HCV) augmentent le risque de carcinome hépatocellulaire (HCC). Par ailleurs, un autre type d'inflammation chronique, les **maladies d'auto-immunité** telles que les maladies d'inflammation de l'intestin (IBD) augmentent également grandement le risque de développer un cancer colorectal¹⁹⁸. De manière intéressante, toutes les maladies auto-immunes induisant de l'inflammation chronique n'augmentent pas le risque de cancers. Ainsi, le psoriasis ou l'arthrite rhumatoïde ne sont pas impliqués dans la progression tumorale.

Deuxièmement, l'inflammation chronique peut aussi être induite par des **expositions environnementales**. La meilleure illustration de ce fait est l'induction de maladies pulmonaires obstructives chroniques et de cancers du poumon suite à l'exposition à certaines particules présentes dans la fumée de tabac^{199,200}. Aussi, d'autres cancers tels que le HCC peuvent être initiés par l'inflammation chronique induite par une consommation d'alcool chronique et l'obésité²⁰¹⁻²⁰³.

Troisièmement, un type d'inflammation bien différent est celui qui suit le développement tumoral. En effet, la plupart des tumeurs solides sont capables de remodeler leur **environnement tumoral** en induisant une réponse inflammatoire afin de contribuer également à la progression tumorale. Les oncogènes, capables de déclencher une réponse inflammatoire et le recrutement de cellules immunitaires pro-tumorales sont à l'origine de ce remodelage²⁰⁴. Ce concept est décrit plus en détails dans la **section 1.4.1.2.1**.

Finalement, la **radiation** et la **chimiothérapie** peuvent induire un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) ou une mort nécrotique massive des cellules cancéreuses et des tissus adjacents qui déclenchent une réponse inflammatoire puissante semblable à la réponse de cicatrisation des plaies²⁰⁵. Selon les circonstances, celle-ci peut avoir des propriétés pro- ou anti-tumorales non discutées ici.

De ce fait, sur les 10% de cancers liés à des mutations germinales et les 90% des cancers liés à des mutations somatiques et facteurs environnementaux, plus de 20% des cancers sont liés à des infections chroniques. Des études épidémiologiques, confirmant que l'inflammation chronique est un facteur de prédisposition important pour le développement de cancers, ont poussé de nombreuses équipes à tenter d'en élucider les mécanismes responsables.

1.4.1.2 Les facteurs clés dans l'inflammation liée aux cancers

Quel que soit la cause sous-jacente à l'inflammation chronique, celle-ci peut devenir pro-tumorigénique par des mécanismes variés capables d'induire notamment une instabilité génomique, une augmentation de l'angiogenèse, une altération de l'état épigénétique du génome et une augmentation de la prolifération. Ces mécanismes font principalement intervenir (i) l'inflammation induite par les oncogènes, (ii) le facteur de transcription NF- κ B et (iii) les cytokines et chimiokines.

1.4.1.2.1 L'inflammation induite par les oncogènes

Deux sources de voies de l'inflammation peuvent induire des cancers, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque²⁰⁴. D'un côté, la **voie extrinsèque** repose sur l'inflammation chronique ou les infections pour conduire à une augmentation du risque de cancer (p. ex., les maladies d'inflammation de l'intestin). De l'autre, la **voie intrinsèque** repose sur des altérations génétiques d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeur comme cause première de cancer. En effet, il est maintenant admis que ces altérations génétiques affectent l'expression d'une variété de gènes inflammatoires et mènent au recrutement de cellules immunitaires pro-tumorales. Basé sur ce renouvellement continu et la prolifération induite par l'inflammation associées aux tumeurs, les tumeurs ont été décrites comme des « plaies qui ne guérissent pas »²⁰⁶.

Par exemple, des mutations dominantes du proto-oncogène Ras, impliqué dans la signalisation des MAPK-Ras-Raf, permettent non seulement d'induire la prolifération cellulaire, la croissance tumorale et l'angiogenèse de manière intrinsèque mais induisent

également l'expression d'une variété de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires²⁰⁷. Parmi eux, les cytokines IL-1, IL-6 et IL-11 ainsi que la chimiokine IL-8 contribuent ainsi au pouvoir oncogénique de Ras^{208,209}. En outre, la production de cytokines et radicaux libres induite par les oncogènes stimule le recrutement de cellules immunitaires qui vont à leur tour produire de nouvelles cytokines et radicaux libres créant ainsi une boucle de rétroaction positive contribuant à la carcinogénèse. Un autre oncogène, MYC, qui encode pour un facteur de transcription surexprimé dans un grand nombre de tumeurs, affecte non seulement la prolifération cellulaire mais induit également un remodelage du microenvironnement tumoral. Celui-ci est dicté par une production de plusieurs chimiokines à l'origine du recrutement de cellules immunitaires (p.ex., mastocytes)²¹⁰ et par la production de la cytokine IL-1 β ²¹¹, tous impliqués dans l'angiogénèse et la croissance tumorale.

De manière intéressante, certains suppresseurs de tumeur peuvent aussi moduler la production de médiateurs inflammatoires. Les suppresseurs de tumeur von Hippel-Lindau (VHL)²¹², TGF- β ²¹³ et PTEN²¹⁴ font partie de cette catégorie²¹⁵.

1.4.1.2.2 Le facteur de transcription NF- κ B

Même si l'engagement des TLRs et autres récepteurs de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-1 mènent à l'activation de voies de signalisation importantes, c'est le facteur de transcription NF- κ B est qui joue un rôle central dans l'inflammation et l'immunité innée²¹⁶. Il est par conséquent un médiateur clé dans la carcinogénèse induite par l'inflammation. NF- κ B a une variété d'activités pro-tumorales, de la **prolifération** à l'**angiogénèse**, et de la **résistance à la nécrose et apoptose** aux **métastases**^{217,218}. De nombreuses études génétiques d'inactivation de NF- κ B chez la souris ont permis de valider son rôle dans la promotion de développement tumoral dans les cancers colorectaux²¹⁹⁻²²¹ et dans les cancers du foie²²².

1.4.1.2.3 Les cytokines et chimiokines

Les cytokines, médiateurs clés de l'inflammation et de la réponse immune jouent un rôle important dans la carcinogénèse induite par l'inflammation. Alors que certaines, impliquées dans la réponse antibactérienne sont **pro-inflammatoires** (p. ex., IL-1, IL-6, IL-17, IL-23 et TNF- α), d'autres sont **anti-inflammatoires** (p. ex., IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β et IFN- α) et permettent de temporiser cette réponse dans le temps. Par conséquent, selon l'équilibre établi par ces cytokines, leur effet collectif peut être soit pro- ou anti-tumoral.

De manière générale, une exposition soutenue à des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires a des propriétés pro-tumorales. Par exemple, IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire qui promeut la formation de tumeurs en activant la signalisation JNK menant à l'augmentation de plusieurs oncogènes²²³. Par ailleurs, TNF- α , une autre cytokine pro-inflammatoire, promeut la carcinogénèse dans plusieurs modèles expérimentaux²²⁴⁻²²⁶, notamment en activant NF- κ B²²⁷. TNF- α permet d'augmenter la croissance tumorale, stimuler l'angiogénèse, causer des dommages à l'ADN et augmenter le pouvoir métastatique des tumeurs²²⁸.

Au contraire, IL-10 et TGF- β sont des cytokines anti-inflammatoires ayant par conséquent un rôle de suppresseur de tumeur. Par exemple, IL-10 inhibe NF- κ B, diminuant ainsi la production d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-6 et IL-12²²⁹. Ainsi, une délétion de l'IL-10 chez la souris infectée par *Helicobacter hepaticus* mène à une augmentation de l'inflammation chronique et du cancer colorectal associé aux colites²³⁰.

1.4.1.2.4 Quelques mécanismes supplémentaires suggérés

Un stimulus inflammatoire mène au recrutement et à l'activation d'une variété de cellules immunitaires qui libèrent une grande quantité d'**espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène (RONS)**. Les RONS sont des radicaux rendus très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés. Lorsqu'ils sont libérés en concentration

importante et sur une période de temps prolongée, ils peuvent mener à la carcinogénèse²³¹.

D'autre part, les molécules de la voie des **prostaglandines** (PGEs) telles que les cyclooxygénases sont des médiateurs clés dans l'inflammation et les cancers associés à l'inflammation. L'isoforme COX-2 est responsable de l'augmentation de l'activité de la cyclooxygénase induite par l'inflammation chronique. COX-2 est particulièrement surexprimé dans les cancers colorectaux²³² mais aussi dans d'autres types de cancers et peut affecter la prolifération, le taux de mutations de l'ADN, l'angiogenèse, l'apoptose et les métastases²³³.

1.4.2 La carcinogénèse colorectale associée à la colite ulcéreuse

Le cancer colorectal (CRC) est le 3^{ème} cancer le plus commun chez l'homme et la femme et la 2^{ème} cause de mortalité liée au cancer au Canada avec une prévision estimée de 26 900 nouveaux cas diagnostiqués et 9 700 morts en 2020. Le cancer colorectal associé à la colite représente 1% des CRC. Le lien entre une inflammation chronique et une tumorigénèse accrue n'est plus à débattre dans les maladies inflammatoires de l'intestin (IBDs), y compris dans la colite ulcéreuse (UC) et moindrement dans la maladie de Crohn ^{234 234,235}.

1.4.2.1 Les spécificités du cancer colorectal associé aux maladies d'inflammation de l'intestin

1.4.2.1.1 Cancer colorectal sporadique vs. cancer colorectal associé à la colite

Les tumeurs colorectales sont d'origine épithéliale et se développent suite à des mutations séquentielles d'activation de plusieurs oncogènes et inactivation d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeur dans les voies de signalisation du gène *adenomatous polyposis coli* (APC), K-Ras, « deleted in colorectal cancer » DCC et p53 ²³⁶. De plus, une étude du laboratoire et d'autres équipes ont également démontré que la perte du gène suppresseur de tumeur Fbxw7 peut aussi être impliquée dans la

carcinogénèse colorectale (**Annexe I**). Une accumulation plutôt qu'un ordre particulier d'apparition de ces événements semble être primordiale pour la tumorigénèse colorectale (**Figure 9., bas**). Elles peuvent être d'origine héréditaire ou liées à des facteurs environnementaux. Le cancer colorectal associé à des IBDs et le cancer colorectal sporadique ont beaucoup de similitudes et émergent à partir de muqueuse dysplasique précancéreuse. Les différences entre les deux cancers impliquent une augmentation du taux de mutations, la délétion précoce de gènes tel que p53 dans le cancer associé à la colite²³⁷, et une altération plus tardive du gène APC²³⁸(**Figure 9., haut**). De cette façon, 2/3 des cancers sporadiques sont issus de polypes alors que les cancers associés aux IBDs sont issus de muqueuse dysplasique aplatie²³⁹.

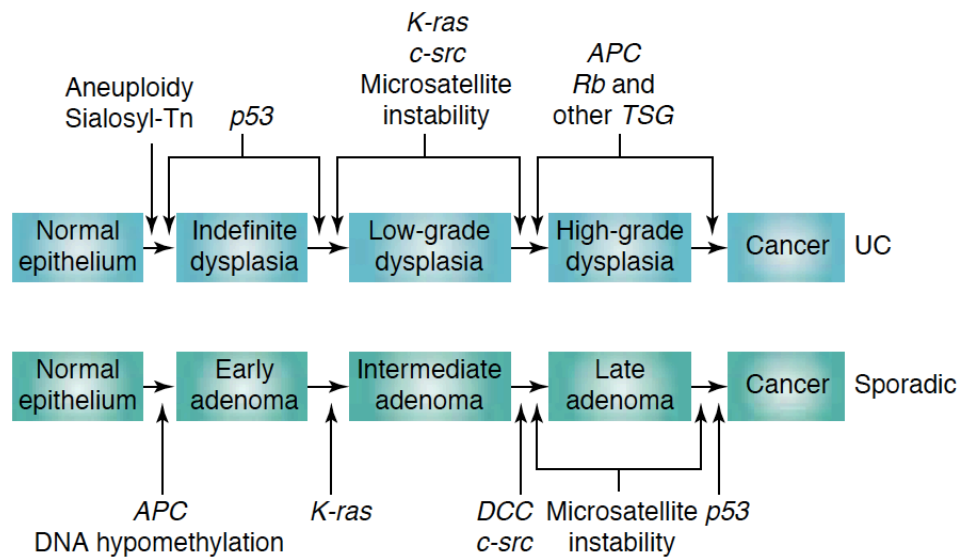


Figure 9. – Une comparaison du développement en plusieurs étapes du cancer associé aux maladies de l’inflammation de l’intestin (haut) et du cancer colorectal sporadique (bas). Les deux types de cancers proviennent d’un développement en plusieurs étapes avec plusieurs mutations. La seule différence évidente est la position dans la séquence de mutations dans les gènes APC et p53. Abréviations : DCC, « deleted in colorectal cancer »; Rb, rétinoblastome; TSG, gène suppresseur de tumeur; UC, colite ulcéreuse. Adapté avec permission de Springer Nature : Trends in Molecular Medicine (Rhodes JM and Campbell BJ)²⁴⁰ © 2002.

1.4.2.1.2 La barrière épithéliale intestinale dans le contrôle des infections microbiennes

La lumière de l'intestin est habitée par $\sim 10^{14}$ bactéries commensales avec plus de 500 espèces. Ces microbes et la *lamina propria* intestinale, tissu conjonctif qui tapisse la muqueuse digestive, sont séparés par seulement une **monocouche de cellules épithéliales** (c.-à-d. cryptes et villi) dont la rupture peut fréquemment mener à l'invasion des microbes et l'activation subséquente du système immunitaire intestinal, résultant en des maladies inflammatoires de l'intestin. Cette monocouche est continuellement renouvelée par des cellules souches épithéliales intestinales (IESCs) à la base de la crypte^{241,242}. La diversité des fonctions de l'épithélium intestinal repose sur une grande variété de lignées cellulaires, tels que les entérocytes, les cellules entéroendocrines, les cellules calciformes et les cellules de Paneth. Elles vont du maintien des fonctions digestives ou de la barrière épithéliale à l'établissement d'un lien entre le système central et le système neuroendocrinien entérique. De plus, les cellules calciformes et les cellules de Paneth sécrètent des **mucines** ou le **facteur de trèfle 3**^{243,244} ainsi que des **peptides antimicrobiens (AMPs)**^{245,246} dans le **lumen** afin de renforcer la barrière biochimique et physique entre les bactéries, la monocouche d'épithélium et les cellules immunitaires sous-jacentes (**Figure 10.**).

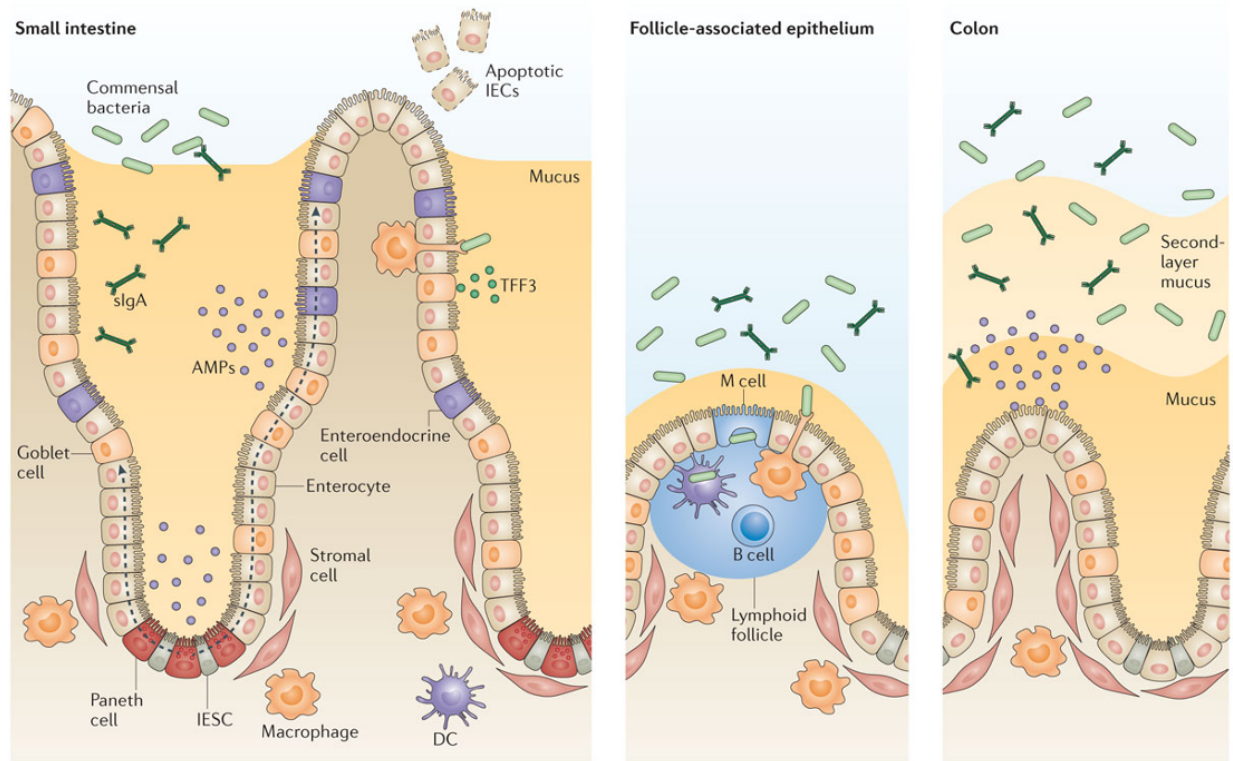


Figure 10. – Les cellules épithéliales intestinales (IECs) forment une barrière physique et biochimiques qui maintient la ségrégation entre les communautés microbiennes luminales et le système immunitaire mucosal. La niche de cellules épithéliales intestinales souches (IESC), contenant des cellules épithéliales, stromales et hématopoïétiques, contrôle le renouvellement continu de la couche de cellules épithéliales grâce aux cellules souches résidentes de la crypte. Les IECs différenciées – à l’exception des cellules de Paneth – migrent vers le haut de l’axe crypte-villus, comme indiqué par la flèche pointillée. Les cellules calciformes et les cellules de Paneth sécrètent du mucus et des protéines antimicrobiennes (APMs) pour promouvoir l’exclusion des bactéries de la surface épithéliale. La transcytose et la libération luminaire des IgA sécrétoires (sIgA) contribuent en outre à cette fonction de barrière. Les cellules M et les cellules calciformes assurent la médiation du transport des antigènes luminaux et des bactéries vivantes à travers la barrière épithéliale vers les cellules dendritiques (DC), et les macrophages résidant dans l’intestin échantillonnent la lumière à travers les dendrites transépithéliales. Abréviations : TFF3, facteur de trèfle 3. Adapté de Springer Nature : Nature Reviews Immunology (Peterson LW and Artis D)²⁴⁷. 2014.

Parmi les **cellules immunitaires intestinales**, les **macrophages résidants** sont la première ligne de défense contre les pathogènes envahisseurs via l’expression des PAMPs. A l’état basal, les macrophages maintiennent une homéostasie intestinale en (i)

engloutissant les cellules apoptotiques, (ii) promouvant le développement de cellules T régulatrices, ou (iii) en encourageant la prolifération de progéniteurs des cellules épithéliales. Cependant dans les maladies inflammatoires de l'intestin, les macrophages entraînent directement la progression de l'inflammation intestinale en libérant de grandes quantités de médiateurs inflammatoires, tels que TNF- α , IL-6 ou IL-1 β . Ces cytokines, associées à l'activation de NF- κ B, STAT3 et des MAPK, contribuent à la progression de tumeur dans le cancer colorectal. Néanmoins, une propriété importante des macrophages est aussi leur capacité à réagir à des signaux de désactivation puissants, tel que la cytokine immuno-modulatrice IL-10. Celle-ci représente un frein nécessaire afin de contrôler le temps et la durée de l'inflammation du colon. D'autres types de cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques dans l'intestin grêle et les éosinophiles et mastocytes dans le colon sont aussi responsables d'une première réponse contre de potentiels pathogènes et peuvent être impliqués le processus tumoral intestinal.

Les **cellules épithéliales** (ECs) jouent aussi un rôle important dans la réponse aux pathogènes. Elles expriment en effet aussi une série de PRRs dont les TLRs, NLRs et RLRs²⁴⁸. Des études récentes ont montré que l'expression des TLRs et leurs protéines associées telle que MyD88 à la membrane des cellules épithéliales aurait un rôle pathogène dans le modèle d'inflammation chronique de colite. L'expression de certains autres récepteurs tels que les NODs est seulement induite en cas d'inflammation menant à l'amplification de la réponse inflammatoire en induisant la sécrétion de cytokines. Ainsi les récepteurs exprimés à l'état basal pourraient participer à l'intégrité de la barrière épithéliale, alors que les récepteurs surexprimés pendant l'inflammation pourraient contribuer à la sévérité de la maladie.

1.4.2.1.3 De l'inflammation chronique au cancer colorectal associé aux maladies de l'inflammation de l'intestin

Le risque de développer un cancer colorectal pour les patients atteints de UC dépend grandement de l'étendue et de la durée de la maladie. La disponibilité de modèles précliniques a permis une étude extensive des mécanismes liant l'inflammation au

développement de cancer dans un contexte de CAC. Le CAC peut être induit chez la souris par injection d'un pro-carcinogène activé dans les entérocytes, l'**azoxyméthane (AOM)**. Une exposition à l'AOM suffit pour induire le cancer avec une incidence faible. Elle peut cependant être augmentée par 3 cycles d'exposition au **dextran sulfate sodium (DSS)**, un irritant qui induit une inflammation du colon par érosion de la barrière muqueuse, exposant la *lamina propria* aux bactéries commensales²⁴⁹.

La plupart des mécanismes à l'origine des cancers colorectaux associés aux IBDs sont communs à de nombreux autres cancers liés à l'inflammation chronique, tels que le stress oxydatif via les RONS²⁵⁰ et la voie de signalisation NF- κ B^{220,251}. Cependant, certains mécanismes additionnels sont liés à la spécificité du tissu intestinal.

Premièrement, le **TNF- α** a un rôle central dans les IBDs²⁵², ainsi, sa signalisation représente un potentiel mécanisme pro-tumoral dans le CAC. Alors que l'activation de TNFR1 est connue pour induire l'apoptose, TNFR2 promeut la survie cellulaire via l'activation de NF- κ B et d'autres voies de signalisation. Ainsi, l'expression de TNFR2 est augmentée dans les cellules épithéliales intestinales suite à une exposition au DSS^{253,254} et la signalisation NF- κ B est augmentée dans un modèle AOM-DSS suite à l'activation de TNFR2²⁵³. De plus, il a été montré que l'activation de TNFR2 dans les IECs induit une augmentation de l'expression de kinases et cytokines responsables de la rupture des jonctions serrées²⁵⁵. De manière intéressante, un traitement des souris avec un anticorps anti-TNF diminue le nombre et la taille des tumeurs induites²⁵³.

Une autre cytokine impliquée dans la pathogénèse du CAC est l'**IL-6**. IL-6 produit par certaines cellules immunitaires et les cellules cancéreuses active des voies de signalisation via son récepteur membranaire ou cytoplasmique IL-6R pour induire une signalisation en trans. La liaison de l'IL-6 à son récepteur induit, entre autres, la signalisation du capteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3) impliqué dans la prolifération cellulaire, la survie, l'angiogenèse, les métastases, l'adhésion cellulaire et l'inflammation²⁵⁶. Des études montrent qu'un traitement avec des anticorps anti-IL6R mais aussi sgp130Fc, une protéine bloquant spécifiquement la signalisation trans, limitent le développement tumoral dans un modèle AOM-DSS²²¹. De plus, dans le même modèle,

l'activation d'IL-6R induit une activation de STAT3 et une augmentation de la prolifération des cellules tumorales^{223,257} révélant deux cibles thérapeutiques jouant un rôle important dans le CAC.

Troisièmement, les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les **cellules Th17** (p. ex., IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22) nécessaires pour la réponse immune adaptative dans les IBDs, sont aussi impliquées dans la pathogénèse du CAC. En effet, la délétion de l'IL-23 qui contribue à la différenciation de cellules T en Th17, mène à une diminution de l'inflammation dans un modèle de tumeur cutanée et une résistance à la progression tumorale²⁵⁸. Plus spécifiquement, des délétions génétiques de l'IL-17A ou inhibition par traitement aux anticorps anti-IL-17A diminuent le développement tumoral et l'inflammation intestinale (c.-à-d., diminution de l'IL-6, TNF et autres cytokines) dans des modèles DSS seul ou AOM-DSS, respectivement^{259,260}. Des études similaires avec l'IL-21 et IL-22 indiquent que les cellules Th17 induisent un microenvironnement tumoral pro-inflammatoire qui active des signalisations promotrices de la tumorigénèse.

Finalement, le **microbiote intestinal** contribue grandement, non seulement au développement de colite, mais aussi au développement de la néoplasie. Dans plusieurs modèles murins pour les IBDs, les bactéries commensales ou certaines bactéries spécifiques (p. ex., *Helicobacter hepaticus*, *Escherichia coli* NC101) sont requises pour initier l'inflammation et le développement de cancer²⁶¹⁻²⁶³. Ainsi les microbes peuvent contribuer à la carcinogénèse colorectale en perturbant la balance entre la flore protectrice (tolérogène) et la flore agressive (pro-inflammatoire, pro-tumorale) ou en changeant le nombre, la diversité et la stabilité de bactéries commensales (dysbiose). Certaines toxines produites par ces organismes peuvent aussi activer la voie STAT3, la production de Th17 et la formation de tumeurs colorectales²⁶⁴. Par ailleurs, les signalisations des PRRs, plus particulièrement des TLRs, responsables de la réponse antimicrobienne jouent un rôle complexe dans l'inflammation intestinale. Il a été proposé que pendant les stades précoces de la colite, les PRRs promeuvent l'inflammation, cependant ils peuvent aussi la réprimer et promouvoir la cicatrisation²⁶⁵. Globalement,

TLR4 promeut la tumorigénèse colorectale dans le modèle AOM-DSS via la production de RONS²⁶⁶.

1.4.2.2 Thérapies actuelles contre le cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse

Les patients atteints de IBDs ont un risque accru de développer des cancers colorectaux associés à la colite. Ce risque est directement proportionnel à l'**ampleur** et la **durée de l'inflammation** médiée par la présence de cellules immunitaires (p. ex. neutrophiles, fibroblastes, DCs, macrophages et cellules T) qui sont capables de sécréter de nombreux médiateurs solubles dont certaines cytokines^{223,267-269}. La pertinence fonctionnelle de ces cytokines sur le CAC a été vérifiée par des traitements aux **anticorps** (p. ex. anti-TNF²⁷⁰, IL-6R²²³, IL-21) ou **inhibiteurs** (p. ex., gp130Fc pour IL-6R, IL-22) des cytokines et leurs récepteurs dans des modèles expérimentaux murins. Cependant, malgré l'utilisation d'anticorps anti-TNF (p. ex., Infliximab, adalimumab, certolizumab et golimumab) et des essais cliniques en cours pour traiter les IBDs, ils ne sont pas encore considérés pour le traitement de CAC et des études cliniques seront nécessaires pour vérifier leur potentiel chez ces patients.

1.4.3 Conclusion

Il existe une relation étroite entre l'inflammation de l'intestin et la néoplasie. Alors que des évidences claires montrent un lien entre l'inflammation chronique et le cancer colorectal, les mécanismes cellulaires et microbiens restent à être clarifiés. Les évidences expérimentales indiquent que les systèmes de l'immunité innée et adaptative ont chacun un rôle à jouer et que la flore bactérienne y contribue aussi.

1.5 Objectifs

D'après les connaissances antérieures à cette thèse, il n'était pas entièrement clair si IL-17RD est un véritable suppresseur de tumeur ou si ses fonctions physiologiques alternatives lui confèrent un rôle d'oncogène *in vivo*. En effet, dans ce contexte de carcinogénèse, aucun modèle murin n'a été utilisé pour répondre à cette interrogation.

De plus, l'étude de son rôle dans l'inflammation est menée de manière complètement indépendante de son rôle pro- ou anti-tumoral alors qu'il est maintenant admis que l'inflammation joue un rôle essentiel dans la tumorigénèse. D'après le rôle connu et controversé d'IL-17RD dans l'inflammation, observé *in vitro* et dans certaines conditions *in vivo* et le rôle de l'inflammation dans la tumorigénèse, il paraît aussi intéressant de s'interroger sur la place d'IL-17RD dans les cancers associés à de l'inflammation chronique. Notamment dans les cancers colorectaux puisque (i) les IBDs sont particulièrement à risque pour le développement de cancers et (ii) IL-17RD est potentiellement impliqué dans certains cancers colorectaux^{103,109}.

Finalement, son rôle dans l'inflammation se restreint-il à la régulation de la voie IL-17 et de certaines voies des TLRs? Certaines évidences nous ont poussé à investiguer son rôle dans la réponse antivirale induite par les récepteurs cytoplasmiques (introduits plus en détails dans le **Chapitre 3**).

1.5.1 Objectif général

L'objectif général de cette thèse était de *déterminer le rôle d'IL-17RD dans le cancer*.

1.5.2 Objectifs spécifiques

Objectif 1 : Évaluer le rôle suppresseur de tumeur d'IL-17RD *in vivo* grâce à un modèle de vieillissement à l'origine de tumorigénèse spontanée (**Chapitre 2**)

Objectif 2 : Évaluer le rôle suppresseur de tumeur d'IL-17RD dans un modèle de cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse (**Chapitre 2**)

Objectif 3 : Évaluer le rôle d'IL-17RD dans la réponse immunitaire innée antivirale
(Chapitre 3 et 4)

1.6 Références

1. Dinarello CA, Mier JW. Interleukins. *Annu Rev Med.* 1986;37:173-178.
2. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol.* 1993;150(12):5445-5456.
3. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity.* 1995;3(6):811-821.
4. Chen Z, O'Shea JJ. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine.* 2008;41(2):71-78.
5. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):479-489.
6. Takahashi N, Vanlaere I, de Rycke R, et al. IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock. *J Exp Med.* 2008;205(8):1755-1761.
7. Wright JF, Bennett F, Li B, et al. The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *J Immunol.* 2008;181(4):2799-2805.
8. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996;183(6):2593-2603.
9. Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res.* 2007;17(5):435-440.
10. Wright JF, Guo Y, Quazi A, et al. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13447-13455.
11. Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, et al. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine.* 1997;9(11):794-800.
12. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics.* 2011;27(12):1739-1740.

13. Novatchkova M, Leibbrandt A, Werzowa J, Neubuser A, Eisenhaber F. The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(5):226-229.
14. Onishi RM, Park SJ, Hanel W, Ho AW, Maitra A, Gaffen SL. SEF/IL-17R (SEFIR) is not enough: an extended SEFIR domain is required for il-17RA-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 2010;285(43):32751-32759.
15. Maitra A, Shen F, Hanel W, et al. Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007;104(18):7506-7511.
16. Shen F, Li N, Gade P, et al. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBPbeta by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Sci Signal.* 2009;2(59):ra8.
17. Civril F, Bennett M, Moldt M, et al. The RIG-I ATPase domain structure reveals insights into ATP-dependent antiviral signalling. *EMBO Rep.* 2011;12(11):1127-1134.
18. Ely LK, Fischer S, Garcia KC. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nat Immunol.* 2009;10(12):1245-1251.
19. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990;87(18):6934-6938.
20. Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 2017;38(5):310-322.
21. Bie Q, Jin C, Zhang B, Dong H. IL-17B: A new area of study in the IL-17 family. *Mol Immunol.* 2017;90:50-56.
22. Nies JF, Panzer U. IL-17C/IL-17RE: Emergence of a Unique Axis in TH17 Biology. *Front Immunol.* 2020;11:341.
23. Su Y, Huang J, Zhao X, et al. Interleukin-17 receptor D constitutes an alternative receptor for interleukin-17A important in psoriasis-like skin inflammation. *Sci Immunol.* 2019;4(36).
24. Ho AW, Shen F, Conti HR, et al. IL-17RC is required for immune signaling via an extended SEF/IL-17R signaling domain in the cytoplasmic tail. *J Immunol.* 2010;185(2):1063-1070.

25. Schwarzenberger P, La Russa V, Miller A, et al. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol.* 1998;161(11):6383-6389.
26. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun.* 2015;60:1-11.
27. Qian Y, Liu C, Hartupée J, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol.* 2007;8(3):247-256.
28. Chang SH, Park H, Dong C. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(47):35603-35607.
29. Sonder SU, Saret S, Tang W, Sturdevant DE, Porcella SF, Siebenlist U. IL-17-induced NF-kappaB activation via CIKS/Act1: physiologic significance and signaling mechanisms. *J Biol Chem.* 2011;286(15):12881-12890.
30. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine.* 2013;64(2):477-485.
31. Liu C, Swaidani S, Qian W, et al. A CC' loop decoy peptide blocks the interaction between Act1 and IL-17RA to attenuate IL-17- and IL-25-induced inflammation. *Sci Signal.* 2011;4(197):ra72.
32. Liu C, Qian W, Qian Y, et al. Act1, a U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17 signaling. *Sci Signal.* 2009;2(92):ra63.
33. Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med.* 2000;191(7):1233-1240.
34. Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine.* 2013;62(2):175-182.
35. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys.* 2013;42:443-468.

36. Shen F, Hu Z, Goswami J, Gaffen SL. Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes. *J Biol Chem.* 2006;281(34):24138-24148.
37. McGovern DP, Rotter JI, Mei L, et al. Genetic epistasis of IL23/IL17 pathway genes in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(6):883-889.
38. Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine.* 2008;41(2):92-104.
39. Xiao Y, Jin J, Chang M, et al. TPL2 mediates autoimmune inflammation through activation of the TAK1 axis of IL-17 signaling. *J Exp Med.* 2014;211(8):1689-1702.
40. Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC. Regulation and function of TPL-2, an I κ B kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res.* 2011;21(1):131-145.
41. Wu L, Chen X, Zhao J, et al. A novel IL-17 signaling pathway controlling keratinocyte proliferation and tumorigenesis via the TRAF4-ERK5 axis. *J Exp Med.* 2015;212(10):1571-1587.
42. Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, et al. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP- β , NF- κ B, and AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(6):H3356-3365.
43. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor- α is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem.* 2004;279(4):2559-2567.
44. Anderson P. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol.* 2008;9(4):353-359.
45. Bulek K, Liu C, Swaidani S, et al. The inducible kinase IKKi is required for IL-17-dependent signaling associated with neutrophilia and pulmonary inflammation. *Nat Immunol.* 2011;12(9):844-852.
46. Herjan T, Hong L, Bubenik J, et al. IL-17-receptor-associated adaptor Act1 directly stabilizes mRNAs to mediate IL-17 inflammatory signaling. *Nat Immunol.* 2018;19(4):354-365.

47. Sun D, Novotny M, Bulek K, Liu C, Li X, Hamilton T. Treatment with IL-17 prolongs the half-life of chemokine CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF). *Nat Immunol.* 2011;12(9):853-860.
48. Mino T, Murakawa Y, Fukao A, et al. Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell.* 2015;161(5):1058-1073.
49. Hartupée J, Liu C, Novotny M, Li X, Hamilton T. IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization. *J Immunol.* 2007;179(6):4135-4141.
50. Karlsen JR, Borregaard N, Cowland JB. Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression by co-stimulation with interleukin-17 and tumor necrosis factor- α is controlled by I κ B- ζ but neither by C/EBP- β nor C/EBP- δ . *J Biol Chem.* 2010;285(19):14088-14100.
51. Hirahara K, Poholek A, Vahedi G, et al. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(5):1276-1287.
52. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology.* 2010;129(3):311-321.
53. Zepp JA, Liu C, Qian W, et al. Cutting edge: TNF receptor-associated factor 4 restricts IL-17-mediated pathology and signaling processes. *J Immunol.* 2012;189(1):33-37.
54. Zhu S, Pan W, Shi P, et al. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis through TRAF3-mediated suppression of interleukin 17 receptor signaling. *J Exp Med.* 2010;207(12):2647-2662.
55. Garg AV, Ahmed M, Vallejo AN, Ma A, Gaffen SL. The deubiquitinase A20 mediates feedback inhibition of interleukin-17 receptor signaling. *Sci Signal.* 2013;6(278):ra44.
56. Zhong B, Liu X, Wang X, et al. Negative regulation of IL-17-mediated signaling and inflammation by the ubiquitin-specific protease USP25. *Nat Immunol.* 2012;13(11):1110-1117.

57. Zhu S, Pan W, Song X, et al. The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK-alpha. *Nat Med.* 2012;18(7):1077-1086.
58. Wan Q, Zhou Z, Ding S, He J. The miR-30a Negatively Regulates IL-17-Mediated Signal Transduction by Targeting Traf3ip2. *J Interferon Cytokine Res.* 2015;35(11):917-923.
59. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 2011;34(2):149-162.
60. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity.* 2019;50(4):892-906.
61. Sparber F, LeibundGut-Landmann S. Interleukin-17 in Antifungal Immunity. *Pathogens.* 2019;8(2).
62. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol.* 2007;8(4):369-377.
63. Gopal R, Monin L, Slight S, et al. Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent Mycobacterium tuberculosis HN878 infection. *PLoS Pathog.* 2014;10(5):e1004099.
64. Chang SH, Dong C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. *Cell Signal.* 2011;23(7):1069-1075.
65. Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol.* 2017;18(6):612-621.
66. Zepp JA, Zhao J, Liu C, et al. IL-17A-Induced PLET1 Expression Contributes to Tissue Repair and Colon Tumorigenesis. *J Immunol.* 2017;199(11):3849-3857.
67. Lai Y, Li D, Li C, et al. The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity.* 2012;37(1):74-84.
68. Furue M, Kadono T. The contribution of IL-17 to the development of autoimmunity in psoriasis. *Innate Immun.* 2019;25(6):337-343.
69. Li X, Bechara R, Zhao J, McGeachy MJ, Gaffen SL. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease. *Nat Immunol.* 2019;20(12):1594-1602.

70. von Stebut E, Boehncke WH, Ghoreschi K, et al. IL-17A in Psoriasis and Beyond: Cardiovascular and Metabolic Implications. *Front Immunol.* 2019;10:3096.
71. Liu D, Tan Y, Bajinka O, Wang L, Tang Z. Th17/IL-17 Axis Regulated by Airway Microbes Get Involved in the Development of Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2020;20(4):11.
72. Chen X, Cai G, Liu C, et al. IL-17R-EGFR axis links wound healing to tumorigenesis in Lrig1(+) stem cells. *J Exp Med.* 2019;216(1):195-214.
73. Wang K, Kim MK, Di Caro G, et al. Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity.* 2014;41(6):1052-1063.
74. Zhang Y, Zoltan M, Riquelme E, et al. Immune Cell Production of Interleukin 17 Induces Stem Cell Features of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Cells. *Gastroenterology.* 2018;155(1):210-223.e213.
75. Wang L, Yi T, Zhang W, Pardoll DM, Yu H. IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. *Cancer Res.* 2010;70(24):10112-10120.
76. Sun C, Kono H, Furuya S, et al. Interleukin-17A Plays a Pivotal Role in Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Dig Dis Sci.* 2016;61(2):474-488.
77. Jin C, Lagoudas GK, Zhao C, et al. Commensal Microbiota Promote Lung Cancer Development via $\gamma\delta$ T Cells. *Cell.* 2019;176(5):998-1013.e1016.
78. Calcinotto A, Brevi A, Chesi M, et al. Microbiota-driven interleukin-17-producing cells and eosinophils synergize to accelerate multiple myeloma progression. *Nat Commun.* 2018;9(1):4832.
79. Zhao J, Chen X, Herjan T, Li X. The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *J Exp Med.* 2020;217(1).
80. Majumder S, Amatya N, Revu S, et al. IL-17 metabolically reprograms activated fibroblastic reticular cells for proliferation and survival. *Nat Immunol.* 2019;20(5):534-545.
81. Sanford M, McKeage K. Secukinumab: first global approval. *Drugs.* 2015;75(3):329-338.

82. Gordon KB, Blauvelt A, Papp KA, et al. Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med.* 2016;375(4):345-356.
83. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med.* 2012;366(13):1190-1199.
84. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, et al. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N Engl J Med.* 2014;371(4):326-338.
85. Hueber W, Patel DD, Dryja T, et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med.* 2010;2(52):52ra72.
86. Paek SY, Frieder J, Kivelevitch D, Menter MA. IL-17 inhibitors for psoriasis. *Semin Cutan Med Surg.* 2018;37(3):148-157.
87. Targan SR, Feagan B, Vermeire S, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Study of Brodalumab in Patients With Moderate-to-Severe Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(11):1599-1607.
88. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut.* 2012;61(12):1693-1700.
89. Furthauer M, Lin W, Ang SL, Thisse B, Thisse C. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol.* 2002;4(2):170-174.
90. Kovalenko D, Yang X, Nadeau RJ, Harkins LK, Friesel R. Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem.* 2003;278(16):14087-14091.
91. Preger E, Ziv I, Shabtay A, et al. Alternative splicing generates an isoform of the human Sef gene with altered subcellular localization and specificity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004;101(5):1229-1234.

92. Xiong S, Zhao Q, Rong Z, et al. hSef inhibits PC-12 cell differentiation by interfering with Ras-mitogen-activated protein kinase MAPK signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50273-50282.
93. Yang RB, Ng CK, Wasserman SM, Komuves LG, Gerritsen ME, Topper JN. A novel interleukin-17 receptor-like protein identified in human umbilical vein endothelial cells antagonizes basic fibroblast growth factor-induced signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(35):33232-33238.
94. Harduf H, Halperin E, Reshef R, Ron D. Sef is synexpressed with FGFs during chick embryogenesis and its expression is differentially regulated by FGFs in the developing limb. *Dev Dyn.* 2005;233(2):301-312.
95. Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell.* 2004;7(1):33-44.
96. Tsang M, Friesel R, Kudoh T, Dawid IB. Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol.* 2002;4(2):165-169.
97. Ziv I, Fuchs Y, Preger E, et al. The human sef-a isoform utilizes different mechanisms to regulate receptor tyrosine kinase signaling pathways and subsequent cell fate. *J Biol Chem.* 2006;281(51):39225-39235.
98. Rong Z, Wang A, Li Z, et al. IL-17RD (Sef or IL-17RLM) interacts with IL-17 receptor and mediates IL-17 signaling. *Cell Res.* 2009;19(2):208-215.
99. Kovalenko D, Yang X, Chen PY, et al. A role for extracellular and transmembrane domains of Sef in Sef-mediated inhibition of FGF signaling. *Cell Signal.* 2006;18(11):1958-1966.
100. Ren Y, Cheng L, Rong Z, et al. hSef potentiates EGF-mediated MAPK signaling through affecting EGFR trafficking and degradation. *Cell Signal.* 2008;20(3):518-533.
101. Yang S, Wang Y, Mei K, et al. Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)-interleukin-17 receptor D (IL-17RD) heteromerization reveals a novel mechanism for NF- κ B activation. *J Biol Chem.* 2015;290(2):861-871.
102. Philips MR. Sef: a MEK/ERK catcher on the Golgi. *Mol Cell.* 2004;15(2):168-169.

103. Duhamel S, Hebert J, Gaboury L, et al. Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation. *Cancer Res.* 2012;72(3):626-635.
104. Ren Y, Cheng L, Rong Z, et al. hSef co-localizes and interacts with Ras in the inhibition of Ras/MAPK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(4):988-993.
105. Fuchs Y, Brunwasser M, Haif S, et al. Sef is an inhibitor of proinflammatory cytokine signaling, acting by cytoplasmic sequestration of NF-kappaB. *Dev Cell.* 2012;23(3):611-623.
106. Korsensky L, Haif S, Heller R, et al. The tumor suppressor Sef is a scaffold for the classical NF-κB/RELA:P50 signaling module. *Cell Signal.* 2019;59:110-121.
107. Mellett M, Atzei P, Bergin R, et al. Orphan receptor IL-17RD regulates Toll-like receptor signalling via SEFIR/TIR interactions. *Nat Commun.* 2015;6:6669.
108. Yang X, Kovalenko D, Nadeau RJ, et al. Sef interacts with TAK1 and mediates JNK activation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38099-38102.
109. Pekow J, Meckel K, Dougherty U, et al. miR-193a-3p is a Key Tumor Suppressor in Ulcerative Colitis-Associated Colon Cancer and Promotes Carcinogenesis through Upregulation of IL17RD. *Clin Cancer Res.* 2017;23(17):5281-5291.
110. Yu HM, Wang C, Yuan Z, Chen GL, Ye T, Yang BW. LncRNA NEAT1 promotes the tumorigenesis of colorectal cancer by sponging miR-193a-3p. *Cell Prolif.* 2019;52(1):e12526.
111. Qian L, Guan J, Wu Y, Wang Q. Upregulated circular RNA circ_0074027 promotes glioblastoma cell growth and invasion by regulating miR-518a-5p/IL17RD signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;510(4):515-519.
112. Zhan L, Mu Z, Yang M, Zhang T, Li H, Qian L. Elevation of circ-PITX1 upregulates interleukin 17 receptor D expression via sponging miR-518a-5p and facilitates cell progression in glioma. *J Cell Biochem.* 2019;120(10):16495-16502.
113. Darby S, Sahadevan K, Khan MM, Robson CN, Leung HY, Gnanapragasam VJ. Loss of Sef (similar expression to FGF) expression is associated with high grade and metastatic prostate cancer. *Oncogene.* 2006;25(29):4122-4127.

114. Sun W, Yang J. Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J Cancer*. 2010;1:136-140.
115. Zisman-Rozen S, Fink D, Ben-Izhak O, et al. Downregulation of Sef, an inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling, is common to a variety of human carcinomas. *Oncogene*. 2007;26(41):6093-6098.
116. Darby S, Murphy T, Thomas H, et al. Similar expression to FGF (Sef) inhibits fibroblast growth factor-induced tumourigenic behaviour in prostate cancer cells and is downregulated in aggressive clinical disease. *Br J Cancer*. 2009;101(11):1891-1899.
117. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002;12(1):9-18.
118. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 2006;24(1):21-44.
119. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(3):903-913.
120. Naor Z, Benard O, Seger R. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(3):91-99.
121. Rane SG. Ion channels as physiological effectors for growth factor receptor and Ras/ERK signaling pathways. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1999;33:107-127.
122. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(11):875-885.
123. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, et al. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*. 1992;358(6385):417-421.
124. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. 1992;258(5081):478-480.

125. Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*. 1988;334(6184):715-718.
126. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):320-344.
127. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1358-1375.
128. Cohen P. Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(2):317-324.
129. Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 5):891-895.
130. Dan I, Watanabe NM, Kusumi A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol*. 2001;11(5):220-230.
131. Uhlik MT, Abell AN, Cuevas BD, Nakamura K, Johnson GL. Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. *Biochem Cell Biol*. 2004;82(6):658-663.
132. Dérijard B, Raingeaud J, Barrett T, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*. 1995;267(5198):682-685.
133. Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, Ulevitch RJ. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem*. 1996;271(6):2886-2891.
134. Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*. 1998;8(19):1049-1057.
135. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):142-149.
136. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(48):6245-6251.

137. Coso OA, Chiariello M, Yu JC, et al. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*. 1995;81(7):1137-1146.
138. Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997;94(14):7337-7342.
139. Dreskin SC, Thomas GW, Dale SN, Heasley LE. Isoforms of Jun kinase are differentially expressed and activated in human monocyte/macrophage (THP-1) cells. *J Immunol*. 2001;166(9):5646-5653.
140. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo j*. 1996;15(11):2760-2770.
141. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000;103(2):239-252.
142. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61(2):203-212.
143. Wiedemann M, Trueb B. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics*. 2000;69(2):275-279.
144. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005;24(50):7455-7464.
145. Zhao Y, Zhang ZY. The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3. *J Biol Chem*. 2001;276(34):32382-32391.
146. Casci T, Vinós J, Freeman M. Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell*. 1999;96(5):655-665.
147. Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA. sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell*. 1998;92(2):253-263.
148. Ren Y, Li Z, Rong Z, et al. Tyrosine 330 in hSef is critical for the localization and the inhibitory effect on FGF signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354(3):741-746.

149. Gonneaud A, Jones C, Turgeon N, et al. A SILAC-Based Method for Quantitative Proteomic Analysis of Intestinal Organoids. *Sci Rep.* 2016;6:38195.
150. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):116-129.
151. Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo j.* 1999;18(3):664-674.
152. Sun X, Wang Y, Yang S, Ren F, Xia Y, Chang Z. Activation of TAK1 by Sef-S induces apoptosis in 293T cells. *Cell Signal.* 2013;25(10):2039-2046.
153. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001;411(6835):355-365.
154. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010;141(7):1117-1134.
155. Rong Z, Ren Y, Cheng L, et al. Sef-S, an alternative splice isoform of sef gene, inhibits NIH3T3 cell proliferation via a mitogen-activated protein kinases p42 and p44 (ERK1/2)-independent mechanism. *Cell Signal.* 2007;19(1):93-102.
156. He Q, Gong Y, Gower L, Yang X, Friesel RE. Sef Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *J Cell biochem.* 2016;117(10):2346-2356.
157. Hori S, Wadhwa K, Pisupati V, et al. Loss of hSef promotes metastasis through upregulation of EMT in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2017;140(8):1881-1887.
158. Mishel S, Shneyer B, Korsensky L, et al. Delivery of the gene encoding the tumor suppressor Sef into prostate tumors by therapeutic-ultrasound inhibits both tumor angiogenesis and growth. *Sci Rep.* 2017;7(1):15060.
159. Peng DH, Kundu ST, Fradette JJ, et al. ZEB1 suppression sensitizes KRAS mutant cancers to MEK inhibition by an IL17RD-dependent mechanism. *Sci Transl Med.* 2019;11(483).
160. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-233.

161. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
162. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-862.
163. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769-773.
164. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(7):3353-3364.
165. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:3-14.
166. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51.
167. Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, et al. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol*. 2007;178(10):6444-6455.
168. Zhu J, Zhang Q, Jin XY, et al. MiR-506 suppresses papillary thyroid carcinoma cell proliferation and metastasis via targeting IL17RD. *J Cell Biochem*. 2019;23(7):2856-2862.
169. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
170. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991;351(6325):355-356.
171. Schneider DS, Hudson KL, Lin TY, Anderson KV. Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*. 1991;5(5):797-807.
172. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-397.

173. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-2088.
174. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099-1103.
175. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 2002;169(1):10-14.
176. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999;11(4):443-451.
177. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*. 2001;13(7):933-940.
178. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-738.
179. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303(5663):1526-1529.
180. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-745.
181. Hidmark A, von Saint Paul A, Dalpke AH. Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *J Immunol*. 2012;189(6):2717-2721.
182. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020;180(6):1044-1066.
183. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3-9.
184. Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*. 2000;67(4):508-514.
185. Latz E, Verma A, Visintin A, et al. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol*. 2007;8(7):772-779.

186. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2009;106(49):20842-20846.
187. Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.* 2003;5(9):581-592.
188. Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol.* 2003;24(12):652-658.
189. Webster SJ, Goodall JC. New concepts in Chlamydia induced inflammasome responses. *Microbes Infect.* 2018;20(7-8):424-431.
190. Billi AC, Gudjonsson JE. Interleukin-17 receptor D: An orphan receptor finds a home in the skin. *Science immunology.* 2019;4(36).
191. Mellett M, Atzei P, Horgan A, et al. Orphan receptor IL-17RD tunes IL-17A signalling and is required for neutrophilia. *Nat Commun.* 2012;3:1119.
192. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539-545.
193. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
194. Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet.* 2008;371(9614):771-783.
195. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-899.
196. de Martel C, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009;70(3):183-194.
197. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009;15(9):1016-1022.

198. Waldner MJ, Neurath MF. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin Immunopathol.* 2009;31(2):249-256.
199. Punturieri A, Szabo E, Croxton TL, Shapiro SD, Dubinett SM. Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities for integrated research. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(8):554-559.
200. Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH, Karin M. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell.* 2010;17(1):89-97.
201. Calle EE. Obesity and cancer. *Bmj.* 2007;335(7630):1107-1108.
202. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006;103(28):10741-10746.
203. Park EJ, Lee JH, Yu GY, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell.* 2010;140(2):197-208.
204. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436-444.
205. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006;20(1):1-15.
206. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986;315(26):1650-1659.
207. Borrello MG, Degl'Innocenti D, Pierotti MA. Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection. *Cancer Lett.* 2008;267(2):262-270.
208. Ancrile B, Lim KH, Counter CM. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007;21(14):1714-1719.
209. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004;6(5):447-458.
210. Soucek L, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med.* 2007;13(10):1211-1218.

211. Shchors K, Shchors E, Rostker F, Lawlor ER, Brown-Swigart L, Evan GI. The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta. *Genes Dev.* 2006;20(18):2527-2538.
212. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature.* 2003;425(6955):307-311.
213. Bierie B, Moses HL. TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(1-2):29-40.
214. Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, et al. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2005;280(23):22473-22481.
215. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7):540-550.
216. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):725-734.
217. Li Q, Withoff S, Verma IM. Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol.* 2005;26(6):318-325.
218. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):749-759.
219. Okayasu I, Ohkusa T, Kajiura K, Kanno J, Sakamoto S. Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. *Gut.* 1996;39(1):87-92.
220. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 2004;118(3):285-296.
221. Becker C, Fantini MC, Schramm C, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity.* 2004;21(4):491-501.

222. Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP, et al. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol.* 1994;145(5):1237-1245.
223. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell.* 2009;15(2):103-113.
224. Oshima M, Oshima H, Matsunaga A, Taketo MM. Hyperplastic gastric tumors with spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia caused by tumor necrosis factor-alpha-dependent inflammation in cyclooxygenase-2/microsomal prostaglandin E synthase-1 transgenic mice. *Cancer Res.* 2005;65(20):9147-9151.
225. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(2):135-141.
226. Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, et al. Tumour necrosis factor-alpha mediates tumour promotion via a PKC alpha- and AP-1-dependent pathway. *Oncogene.* 2002;21(31):4728-4738.
227. Lind MH, Rozell B, Wallin RP, et al. Tumor necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-kappaB inhibition. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004;101(14):4972-4977.
228. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(5):361-371.
229. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008;226:205-218.
230. Berg DJ, Davidson N, Kühn R, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest.* 1996;98(4):1010-1020.
231. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(4):276-285.

232. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*. 1994;107(4):1183-1188.
233. Harris RE. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology*. 2009;17(2):55-67.
234. McDuff FK, Turner SD. Jailbreak: oncogene-induced senescence and its evasion. *Cell Signal*. 2011;23(1):6-13.
235. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut*. 1994;35(11):1590-1592.
236. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-767.
237. Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, et al. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1994;107(2):369-378.
238. Redston MS, Papadopoulos N, Caldas C, Kinzler KW, Kern SE. Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology*. 1995;108(2):383-392.
239. Choi PM, Zelig MP. Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention. *Gut*. 1994;35(7):950-954.
240. Rhodes JM, Campbell BJ. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med*. 2002;8(1):10-16.
241. Crosnier C, Stamataki D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*. 2006;7(5):349-359.
242. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:241-260.

243. Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008;105(39):15064-15069.
244. Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000;97(2):799-804.
245. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(7):503-516.
246. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(5):356-368.
247. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):141-153.
248. Lavelle EC, Murphy C, O'Neill LA, Creagh EM. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2010;3(1):17-28.
249. Parang B, Barrett CW, Williams CS. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol.* 2016;1422:297-307.
250. Barrett CW, Ning W, Chen X, et al. Tumor suppressor function of the plasma glutathione peroxidase gpx3 in colitis-associated carcinoma. *Cancer Res.* 2013;73(3):1245-1255.
251. Shaked H, Hofseth LJ, Chumanevich A, et al. Chronic epithelial NF- κ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2012;109(35):14007-14012.
252. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149-160.
253. Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, et al. Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(4):G850-859.
254. Su L, Nalle SC, Shen L, et al. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology.* 2013;145(2):407-415.

255. Wang F, Schwarz BT, Graham WV, et al. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology*. 2006;131(4):1153-1163.
256. Waldner MJ, Neurath MF. Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Semin Immunol*. 2014;26(1):75-79.
257. Matsumoto S, Hara T, Mitsuyama K, et al. Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J Immunol*. 2010;184(3):1543-1551.
258. Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006;442(7101):461-465.
259. Qi H, Yang H, Xu G, et al. Therapeutic efficacy of IL-17A antibody injection in preventing the development of colitis associated carcinogenesis in mice. *Immunobiology*. 2015;220(1):54-59.
260. Hyun YS, Han DS, Lee AR, Eun CS, Youn J, Kim HY. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(4):931-936.
261. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(1):G7-17.
262. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 2012;338(6103):120-123.
263. Nagamine CM, Rogers AB, Fox JG, Schauer DB. Helicobacter hepaticus promotes azoxymethane-initiated colon tumorigenesis in BALB/c-IL10-deficient mice. *Int J Cancer*. 2008;122(4):832-838.
264. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254-258.
265. Fukata M, Abreu MT. Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(6):680-687.

266. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1869-1881.
267. Neufert C, Becker C, Türeci Ö, et al. Tumor fibroblast-derived epiregulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1428-1443.
268. Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2009;15(2):91-102.
269. Garrett WS, Punit S, Gallini CA, et al. Colitis-associated colorectal cancer driven by T-bet deficiency in dendritic cells. *Cancer Cell*. 2009;16(3):208-219.
270. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, et al. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest*. 2008;118(2):560-70.

Chapitre 2

2 Loss of Interleukin-17 Receptor D promotes chronic inflammation-associated tumorigenesis

Charlotte Girondel^{1,2}, Kim Lévesque¹, Marie-Josée Langlois³, Sarah Pasquin², Marc K. Saba-El-Leil¹, Nathalie Rivard³, Robert Friesel⁴, Marc Servant⁵, Jean-François Gauchat², Sylvie Lesage^{6,7}, and Sylvain Meloche^{1,2,8}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, Quebec, Canada.

²Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

³Department of Immunology and Cell Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

⁴Center for Molecular Medicine, Maine Medical Center Research Institute, Scarborough, Maine, USA.

⁵Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

⁶Department of Immunology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

⁷Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

⁸Molecular Biology Program, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence and requests for materials should be addressed to:

Dr Sylvain Meloche (email: sylvain.meloche@umontreal.ca)

2.1 Mise en contexte

A l'aube de la publication de cet article, il n'est pas entièrement clair si IL-17RD est un véritable gène suppresseur de tumeur *in vivo*. Premièrement, certaines études font part d'un rôle inhibiteur d'IL-17RD dans certaines voies mitogéniques, lui conférant un potentiel rôle de gène suppresseur de tumeur *in vitro*, en inhibant des processus clés liés à la tumorigénèse tels que la prolifération, la survie, la migration et l'invasion. Cependant, quelques autres études lui suggèrent un rôle oncogénique. Cette controverse a notamment été observée dans plusieurs formes de cancers colorectaux. Deuxièmement, un rôle controversé d'IL-17RD est également rapporté dans l'induction de l'inflammation. De manière intéressante, l'inflammation peut aussi être impliquée dans le processus de tumorigénèse, illustré notamment par le cancer colorectal associé aux IBDs. Ces observations soulèvent la question fondamentale : quel rôle joue IL-17RD dans la tumorigénèse *in vivo*, notamment dans le cancer colorectal associé à l'inflammation? De manière surprenante, aucun modèle murin n'a été utilisé dans un contexte de carcinogénèse pour étudier IL-17RD.

Cet article représente la toute première investigation du rôle d'IL-17RD dans la carcinogénèse *in vivo* grâce à deux modèles murins distincts. Les résultats de ces études convergent vers un même rôle de gène suppresseur de tumeur dans des contextes de, (i) carcinogénèse spontanée dans un modèle de vieillissement et, (ii) carcinogénèse colorectale associée à l'inflammation. Grâce à une analyse de séquençage d'ARN sur les tumeurs induites dans notre deuxième modèle, nous avons été capables d'identifier plusieurs éléments nous permettant de proposer une hypothèse mécanistique générale axée sur une inflammation exacerbée suite à la perte d'IL-17RD.

Les deux modèles de cette étude comprennent cependant certaines limites quant à leur utilisation pour la détermination d'un mécanisme précis. Ces limites seront abordées dans la discussion (**Chapitre 5**), avec plusieurs expériences supplémentaires à l'appui.

2.2 Contribution des auteurs

Charlotte Girondel a conceptualisé le projet, mis en place et exécuté la majorité des expériences, analysé les résultats et écrit la première version du manuscrit.

Kim Lévesque a contribué à la mise en place et à l'exécution de plusieurs expériences murines (Figure 1 et 5).

Marie-Josée Langlois a mis en place et contribué à l'exécution des expériences sur les organoïdes et analysé les résultats associés (Figure 3B, C et D).

Sarah Pasquin a exécuté les expériences de FACS et analysé les résultats associés (Figure S1D).

Marc Saba-El-Leil a contribué à la mise en place et à l'exécution du modèle AOM-DSS (Figure 2).

Nathalie Rivard a analysé les résultats associés aux expériences d'organoïdes et contribué aux discussions générales sur le projet.

Robert Friesel a fourni la lignée de souris *Il17rd* knock out.

Marc Servant a contribué aux discussions générales sur le projet.

Jean-François Gauchat a contribué aux discussions générales sur le projet.

Sylvie Lesage a analysé les résultats associés aux expériences de FACS et contribué aux discussions générales sur le projet.

Sylvain Meloche a conceptualisé le projet, analysé les résultats et écrit la première version du manuscrit.

Tous les auteurs ont approuvé la dernière version du manuscrit.

2.3 Abstract

Interleukin-17 receptor D (IL-17RD), also known as Similar expression to FGF genes (SEF), is proposed to act as a signaling hub that negatively regulates mitogenic signaling pathways, like the ERK1/2 MAP kinase pathway, and innate immune signaling. The expression of IL-17RD is down-regulated in certain solid tumors, which has led to the hypothesis that it may exert tumor suppressor functions. However, the role of IL-17RD in tumor biology remains to be studied *in vivo*. Here, we show that genetic disruption of *Il17rd* leads to increased formation of spontaneous tumors in multiple tissues of aging mice. Loss of IL-17RD also promotes tumor development in a model of colitis-associated colorectal cancer, associated with an exacerbated inflammatory response. Colon tumors from IL-17RD-deficient mice are characterized by a strong enrichment in inflammation-related gene signatures, elevated expression of pro-inflammatory tumorigenic cytokines such as IL-17A and IL-6, and increased STAT3 tyrosine phosphorylation. We further show that RNAi depletion of IL-17RD enhances Toll-like receptor and IL-17A signaling in colon adenocarcinoma cells. No change in the proliferation of normal or tumor intestinal epithelial cells was observed upon genetic inactivation of IL-17RD. Our findings establish IL-17RD as a tumor suppressor in mice and suggest that the protein exerts its function mainly by limiting the extent and duration of inflammation.

2.4 Introduction

Cytokines of the interleukin-17 (IL-17) family, which consist of IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E/IL-25, and IL-17F, play a central role in host defense and inflammatory disorders¹. The best characterized members of this family are IL-17A and IL-17F, which are signature cytokines of T helper 17 (Th17) cells and are also produced by additional innate immune cells in peripheral tissues^{1,2}. IL-17A/F orchestrate protection against bacterial and fungal infections at mucosal and epithelial surfaces, but also contribute to the development and chronicity of inflammatory disorders, such as psoriasis and inflammatory arthritis^{1,3}. Antibodies targeting IL-17A have been approved for the treatment of these clinical conditions. Notably, accumulating evidence implicates IL-17A in the initiation and progression of chronic inflammation-associated cancers, especially colitis-associated cancer⁴⁻⁶. In support of this idea, treatment with IL-17A-neutralizing antibody reduces tumor growth in mouse models of colorectal cancer^{4,7}.

IL-17 cytokines signal through members of the IL-17 receptor family, which comprises the five subunits IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD and IL-17RE⁸. IL-17RD, which is also known as Similar expression to FGF genes (SEF), was considered an orphan receptor with no known ligand, but recent evidence suggests that it can act as an alternative receptor for IL-17A in the skin⁹. It was first identified in zebrafish as a feedback inhibitor of fibroblast growth factor (FGF)-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling^{10,11}. Subsequent studies in mammalian cells confirmed the antagonistic role of IL-17RD on activation of ERK1/2 MAPK by FGF receptors, but also by other receptor tyrosine kinases¹². The precise mechanism of inhibition of the MAPK pathway remains unclear, as different studies have proposed that IL-17RD acts at the level of the receptor^{10,13}, Ras¹⁴, or MEK1/2^{11,15,16}. Conversely, other studies have reported that IL-17RD can potentiate ERK1/2 MAPK signaling in specific cellular contexts^{17,18}. On the other hand, IL-17RD was also shown to negatively regulate pro-inflammatory cytokine and Toll-like receptor (TLR)-dependent NF- κ B and interferon regulatory factor (IRF) signaling pathways, resulting in attenuation of inflammatory gene expression^{19,20}. Conflicting studies also reported a regulatory role of IL-17RD in modulating IL-17A

signaling^{9,21,22}. Thus, IL-17RD behaves as a signaling hub that integrates mitogenic and innate immune signaling pathways. However, the pathophysiological impact of IL-17RD expression and the relative importance of IL-17RD-modulated signaling events remain largely unexplored.

Consistent with its role in negatively regulating receptor tyrosine kinase signaling, overexpression of IL-17RD was found to inhibit the proliferation of multiple cancer cell lines *in vitro* and to reduce tumor growth in mouse xenograft models^{12,16,23,24}. Analysis of clinical samples also revealed that IL-17RD mRNA and protein levels are downregulated in a variety of human cancers^{23,25,26}. These observations led to the hypothesis of IL-17RD being a potential tumor suppressor. However, the role of IL-17RD in tumor biology remains to be studied *in vivo*.

In this study, we show that deficiency of IL-17RD leads to increased formation of spontaneous tumors in aging mice. Loss of IL-17RD function also promotes intestinal tumor development in a model of colitis-associated colorectal cancer, associated with a strong inflammatory response and increased TLR and IL-17 signaling. Our findings establish IL-17RD as a tumor suppressor that limits chronic inflammation in mice.

2.5 Results

2.5.1 *Il17rd* is a tumor suppressor gene in mice

Little is known about the physiological roles of IL-17RD and its putative involvement in disease. Comprehensive analysis of IL-17RD mRNA expression in a large panel of normal cell types and tissues from the Human Protein Atlas database show that the gene is ubiquitously expressed in human tissues, with the notable exception of immune cells (Fig. S1A). To directly address whether IL-17RD can suppress tumor development in normal aging mice, we analyzed a large cohort of wild type, *Il17rd*^{+/-} heterozygous and *Il17rd*^{-/-} homozygous null mice for the development of spontaneous malignancies. *Il17rd* mutant mice did not show any obvious phenotype or health issue through adulthood (Fig. 1A). A survival rate of 90% was observed for wild type mice over 24 months, in accordance with the normal survival data of C56BL/6J mice (<https://www.jax.org>). However, we observed that loss of one or two alleles of *Il17rd* compromised health span, resulting in survival rates of 63% and 72%, respectively, at 24 months (Fig. 1B). Whole body necropsy analysis revealed an increased incidence of tumor lesions in *Il17rd*^{+/-} (25%) and *Il17rd*^{-/-} (30.5%) mutant mice as compared to wild type mice (7.7%), suggesting an haploinsufficient role of IL17-RD in tumor suppression (Fig. 1C). Tumors were also observed in a small cohort (n=5) of 18-month-old *Il17rd*^{+/-} and *Il17rd*^{-/-} mice, but not in younger mice, indicating that tumors develop with a long latency (Fig. S1B).

Detailed histological analysis showed that tumors mainly form in the lung, female reproductive organs, lymphoid organs and gastrointestinal system (Fig. 1D, E). We also noticed that some *Il17rd*^{+/-} and *Il17rd*^{-/-} mice developed multiple tumor lesions (Fig. 1E). Overall, we identified 7 different tumor histological types amongst the 29 tumors evaluated, with a high proportion of adenocarcinomas (Fig. 1F). The broad range of tumor sites is consistent with the ubiquitous expression profile of the human IL-17RD gene (Fig. S1A). We further confirmed that IL-17RD mRNA is also expressed in multiple mouse tissues with the highest expression detected in the lung, in agreement with the high

frequency of tumors in this organ (Fig. S1C). Analysis of lymphoid organs showed that the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, activated T cells, B cells, monocyte/macrophages/neutrophils is similar in wild type and *Il17rd*^{-/-} adult mice, suggesting that loss of IL-17RD does not affect immune cell differentiation (Fig. S1D). We conclude from these observations that IL-17RD is a *bona fide* tumor suppressor in vivo whose action is not restricted to a specific tissue.

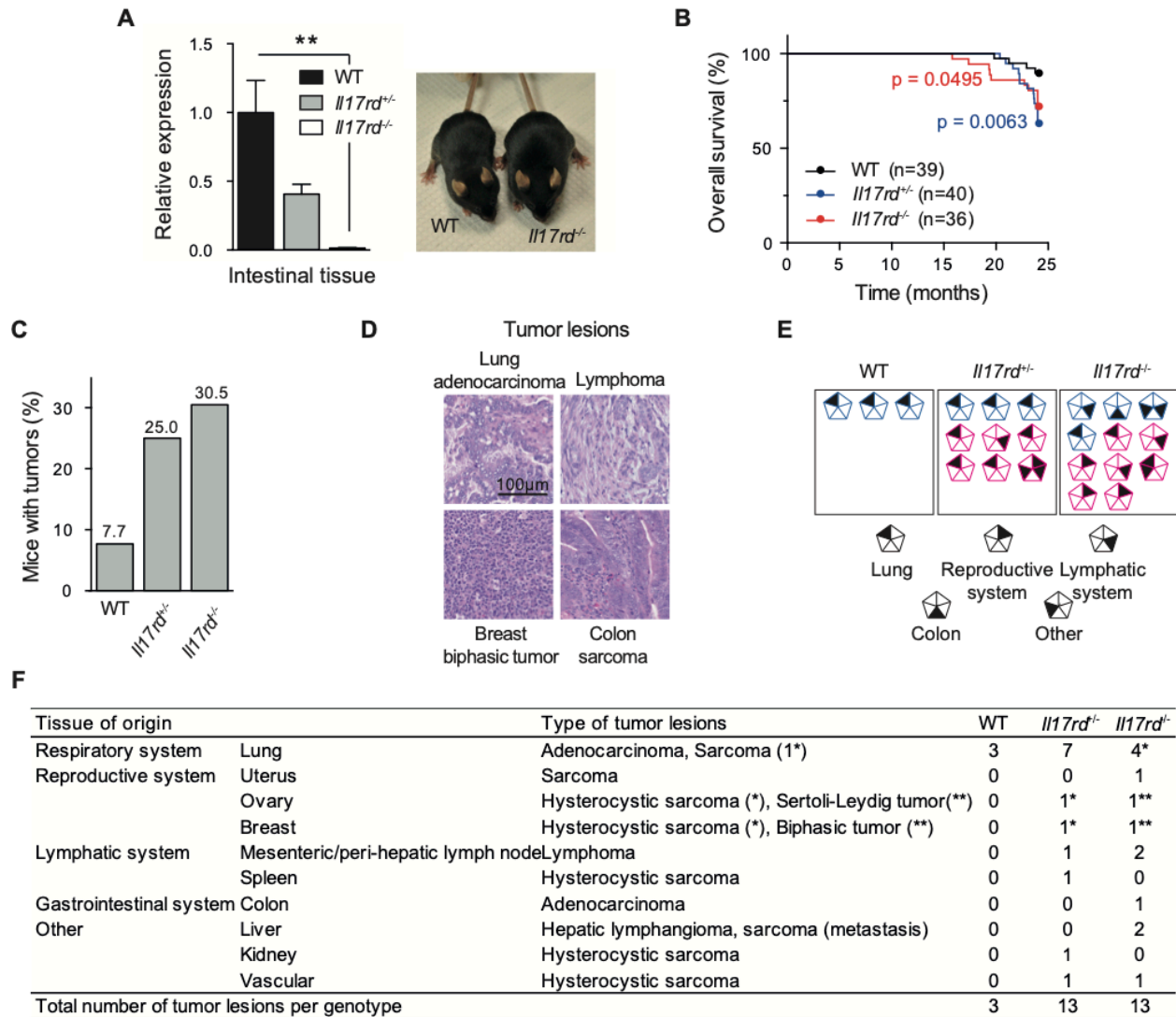


Figure 1. – IL-17RD suppresses spontaneous tumor formation in aging mice. (A) Relative mRNA expression levels of *Il17rd* from intestinal tissue of wild type (WT), *Il17rd*^{+/+} heterozygous and *Il17rd*^{-/-} null mice as determined by qPCR. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 3). **p < 0.01. Right, photograph of adult WT and *Il17rd*^{-/-} mice. (B) Overall survival of WT, *Il17rd*^{+/+} and *Il17rd*^{-/-} mice (n \geq 36 per group). Statistical significance was calculated using the log-rank test. (C) Incidence of spontaneous tumors in WT (n = 39), *Il17rd*^{+/+} (n = 40) and *Il17rd*^{-/-} (n = 36) mice at sacrifice. (D) Representative photomicrographs of H&E-stained tumors. Scale bar, 100 μ m. (E) Schematic representation of tumor localization. Male and female mice are represented by blue and pink pentagons, respectively. (F) Summary of the different tumor lesions diagnosed in WT, *Il17rd*^{+/+} and *Il17rd*^{-/-} mice.

2.5.2 Loss of IL-17RD promotes colitis-associated colorectal tumorigenesis

Given the proposed role of IL-17RD as a regulator of both mitogenic and inflammation signaling, we sought to further explore the tumor suppressor function of the protein in colitis-associated carcinogenesis, which is associated with dysregulated mitogenic signaling and chronic inflammation. To this end, we used the well-established mouse model of colitis-associated colon cancer combining the carcinogen azoxymethane (AOM) with dextran sulfate sodium (DSS)²⁷. Cohorts of age-matched wild type and *Il17rd*^{-/-} mice were injected with a single dose of AOM at 12 weeks, followed by a one-week cycle of 2% DSS to induce gut inflammation (Fig. 2A). Animals were sacrificed 12 weeks post-treatment. IL-17RD-deficient mice did not fully recover from the weight loss induced by DSS treatment and had higher mortality when compared to wild type control mice (Fig. 2B, C). Colons of surviving mice were harvested and analyzed for tumor burden. *Il17rd*^{-/-} mice developed more than twice as many tumors as wild type controls, and these tumors had a greater average size (Fig. 2D, E). Most of the tumors were adenocarcinomas and there was no difference in tumor grade between the two groups (Fig. 2F). IHC analysis of cell proliferation, apoptosis and angiogenesis did not reveal any significant difference between tumors from wild type or *Il17rd*^{-/-} mice (Fig. S2). Notably, macroscopic analysis of colonic tissues showed a marked increase of intestinal inflammation in *Il17rd*^{-/-} mice, as evidenced by colon shortening and by a colitis score based on body weight, stool consistency and rectal bleeding (Fig. 2G, H). These results further demonstrate the tumor suppressor role of IL-17RD in a colitis-associated colon cancer model. The observation that *Il17rd*^{-/-} mice display an exaggerated intestinal inflammatory response suggests a possible contribution of inflammation signaling pathways in promoting tumor development in these mice.

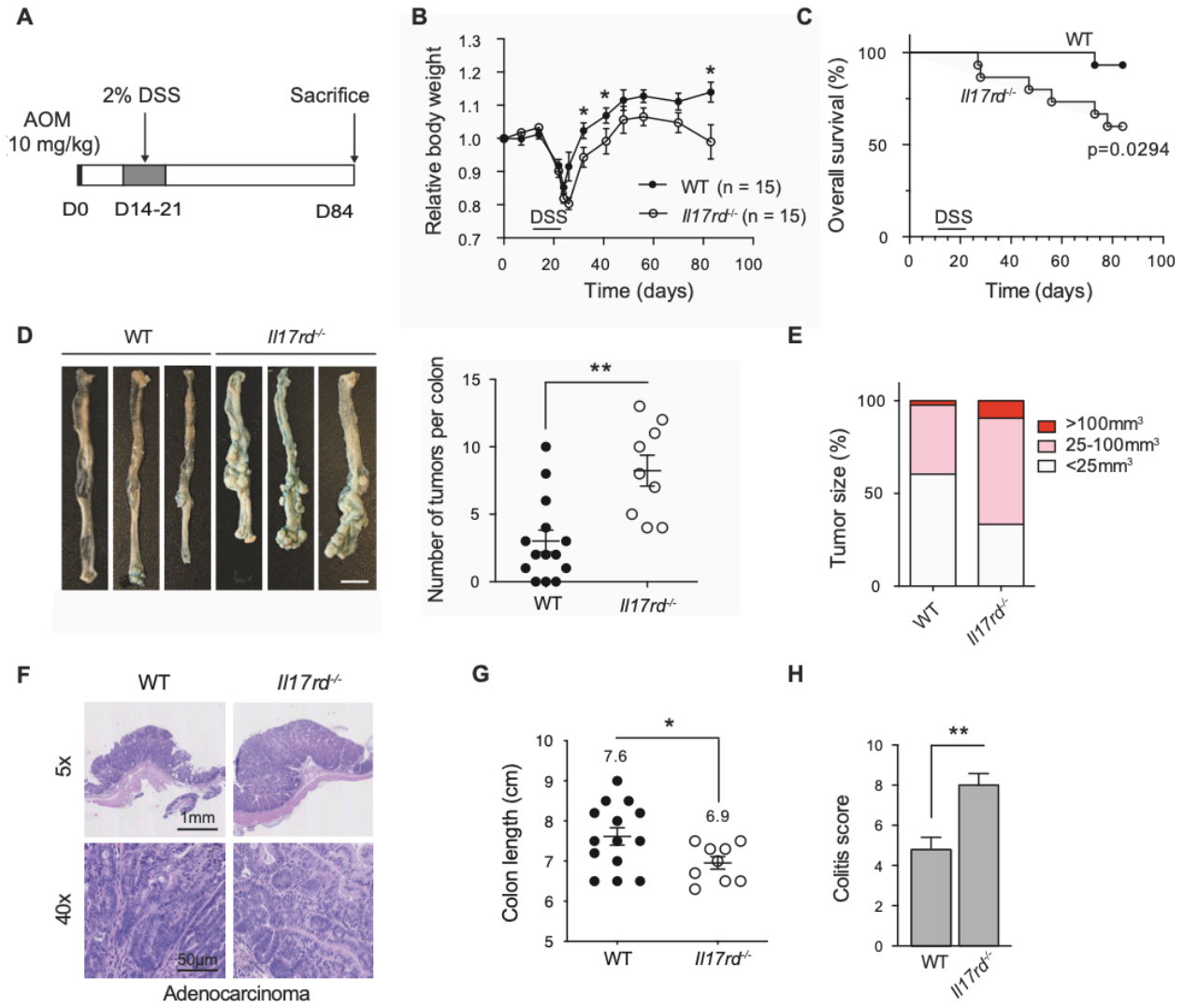


Figure 2. – Loss of IL-17RD promotes colitis-associated colorectal tumorigenesis. (A) Schematic diagram of the AOM-DSS colitis-associated colorectal carcinogenesis study. (B) Relative body weight of WT and *Il17rd^{-/-}* mice during AOM-DSS protocol. Data are means \pm SEM (n \geq 9). *p < 0.05. (C) Overall survival of WT and *Il17rd^{-/-}* mice during AOM-DSS study (n = 15 per group). Statistical significance was calculated using the log-rank test. (D) Representative images of colon tumors and quantification of tumor lesions. Data are means \pm SEM (n \geq 9). **p < 0.01. Scale bar, 10 mm. (E) Distribution of colon tumors according to their size. (F) Representative photomicrographs of H&E-stained tumors from WT and *Il17rd^{-/-}* mice. (G) Colon length. Data are means \pm SEM (n \geq 9). *p < 0.05. (H) Macroscopic colitis score (body weight, stool consistency and rectal bleeding) of mice as an index of disease severity. **p < 0.01.

2.5.3 IL-17RD deficiency does not affect normal or transformed intestinal cells proliferation

To determine if *Il17rd* disruption elicits early pre-neoplastic changes in the intestine, we examined the morphology and proliferation state of the intestinal epithelium. Histological analysis of *Il17rd*^{-/-} colons from 6-week old mice did not reveal any apparent phenotypical alteration (Fig. 3A). The length of the colonic crypts was comparable between wild type and mutant mice. We also failed to detect any change in the number of Ki67-positive and phospho-ERK1/2-positive cells in the two groups (Fig. 3A). To further assess the cell-autonomous role of IL-17RD in regulating intestinal cell proliferation, we generated 3D organoid cultures from the intestinal crypts of wild type and *Il17rd*^{-/-} mice. Intestinal and colonic organoids from IL-17RD-deficient mice developed normally, with crypt-like protrusion branching and cellular proliferation comparable to control organoids (Fig. 3B-D). These findings indicate that loss of IL-17RD has no significant impact on the homeostatic development and proliferation of the intestinal epithelium in young mice.

We also evaluated the impact of IL-17RD expression on the proliferation of transformed intestinal epithelial cells. Depletion of IL-17RD with SmartPool siRNAs did not affect the proliferation rate or activating phosphorylation of ERK1/2 MAPK in human colorectal carcinoma HCT116 cells (Fig. 3E, F). In the murine colon adenocarcinoma cell line MC-38, knockdown of IL-17RD slightly reduced cell proliferation (Fig. 3G). Together, our results indicate that IL-17RD deficiency alone does not affect normal or transformed intestinal cells proliferation.

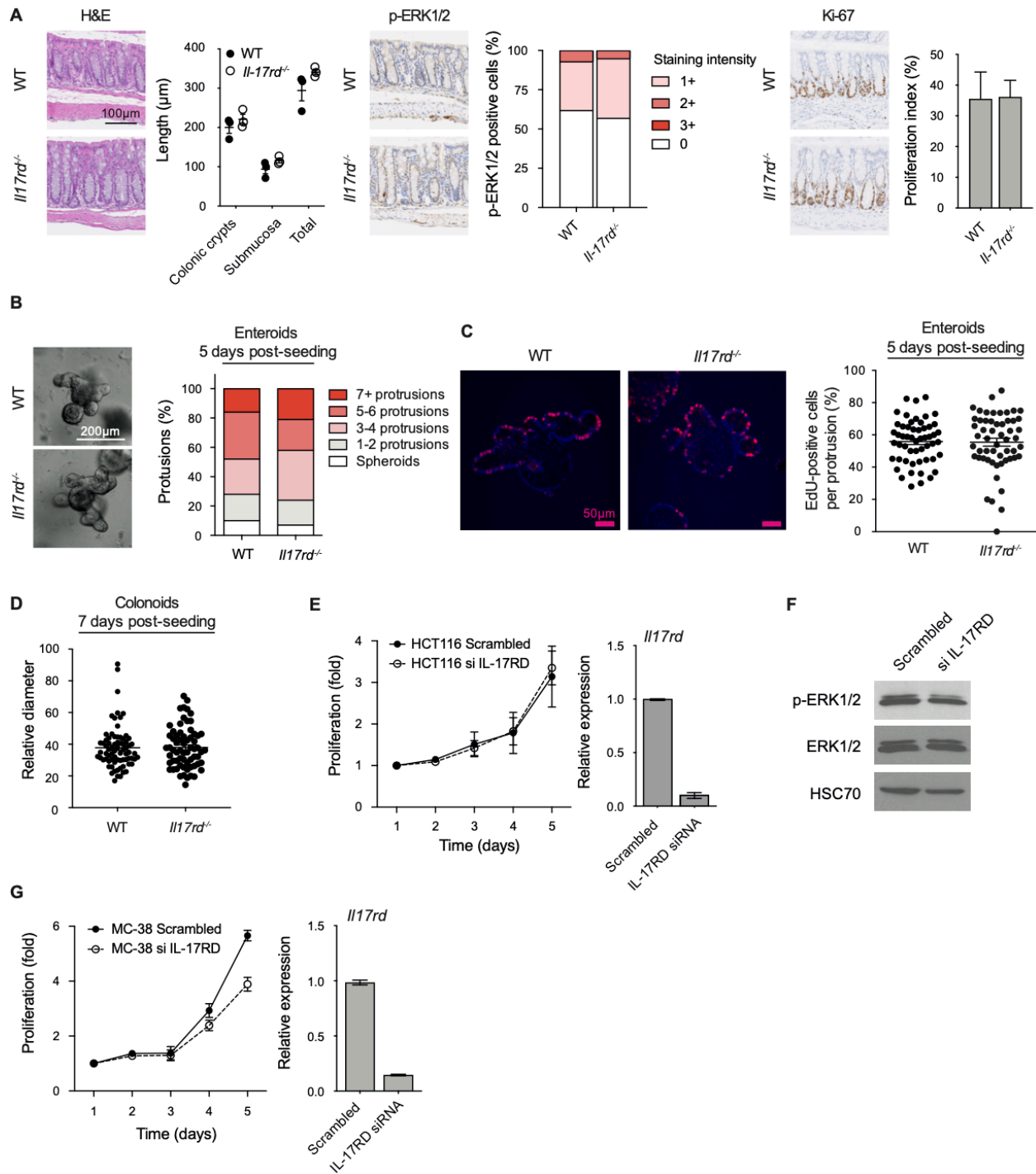


Figure 3. – IL-17RD has no cell-autonomous effect on intestinal cell proliferation. (A) Representative photomicrographs of colon sections from 6-week old mice stained with H&E, Ki67 and phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) antibody. The intensity of p-ERK1/2 staining and the percentage of Ki-67-positive cells was quantified using the Visiormorph software. Scale bar, 100 μm. (B) Images of intestinal organoids derived from WT and *Il17rd*^{-/-} mice

grown in 3D culture. Right, distribution of crypt-like protrusions in organoids. Scale bar, 200 μm . (C) Representative EdU staining of protrusion cells from intestinal organoids. Right, quantification of EdU-positive cells. Bar represents the mean value \pm SEM. Scale bar, 50 μm . (D) Relative diameter of colonoids. Bar represents the mean value \pm SEM. (E) Cell proliferation assay of HCT 116 cells transfected with SmartPool scrambled or IL-17RD siRNAs. Values are expressed as fold increase and represent the mean \pm SD of 3 replicates. Depletion of IL-17RD was confirmed by qPCR analysis of mRNA expression (right panel). (F) Cell lysates were analyzed by immunoblotting with phospho-specific and total ERK1/2 antibodies. (G) Cell proliferation assay of MC-38 cells transfected with SmartPool scrambled or IL-17RD siRNAs. All the experiments were repeated at least three times.

2.5.4 Loss of IL-17RD exacerbates inflammatory responses in colitis-associated colorectal cancer

To investigate the mechanisms underlying the increased colitis-associated colorectal tumorigenesis in IL-17RD-deficient mice, we analyzed the transcriptomes of micro-dissected colon tumors by RNA sequencing. We identified a total of 155 genes that are differentially expressed ($p \text{ adj} < 0.05$; $\text{Log}_2\text{Foldchange} > 1$) in tumors from wild type and *Il17rd*^{-/-} mice subjected to AOM-DSS (Fig. 4A). By GSEA, we identified 18 gene sets significantly enriched ($\text{FDR} < 0.25$) in genes upregulated in *Il17rd*^{-/-} tumors, including 9 gene sets related to inflammatory responses (Fig. S3A). Specifically, the two gene sets with the highest enrichment scores in IL-17RD-deficient tumors were genes expressed in response to bacterium and biotic stimuli (Fig. 4B). Gene Ontology (GO) enrichment analysis identified 11 inflammation related groups of genes among the top 17 most significant ($p < 0.05$) enrichment terms associated to Biological Process (Fig. 4C). Additional bioinformatics analyses by IPA and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis confirmed the strong enrichment in genes associated with inflammation cellular pathways in tumors from *Il17rd*^{-/-} mice (Fig. S3B). No gene signature associated with cell proliferation or the cell division cycle were found to be significantly enriched in *Il17rd*^{-/-} tumors, consistent with the lack of impact of IL-17RD on intestinal tumor cell proliferation. We validated by qPCR that expression of several of the pro-inflammatory cytokines and chemokines found in these gene signatures was up-regulated in colorectal tumors of *Il17rd*^{-/-} mice (Fig. 4D). Importantly, we also measured an increase in the circulating levels of these cytokines in *Il17rd*^{-/-} mice at the end of the AOM-DSS protocol (Fig. 4E). In agreement with the increased expression of pro-inflammatory cytokines, we observed an enhanced tyrosine phosphorylation of STAT3 in *Il17rd*^{-/-} tumors (Fig. 4F).

We wanted to investigate if there were signs of chronic inflammation in our longitudinal study of aging *Il17rd*^{-/-} mice. Interestingly, we observed that expression of pro-inflammatory cytokine genes such as *Il1b*, *Il6*, *Tnf* and *Tgfb1* is up-regulated in the intestinal tissue of *Il17rd*^{-/-} mice at 18 months and, more significantly, at 24 months of age

(Fig. S4). Collectively, our results suggest a major role of inflammation in the promotion of tumorigenesis induced by IL-17RD deficiency in colitis-associated colorectal cancer and, possibly, other age-related cancers.

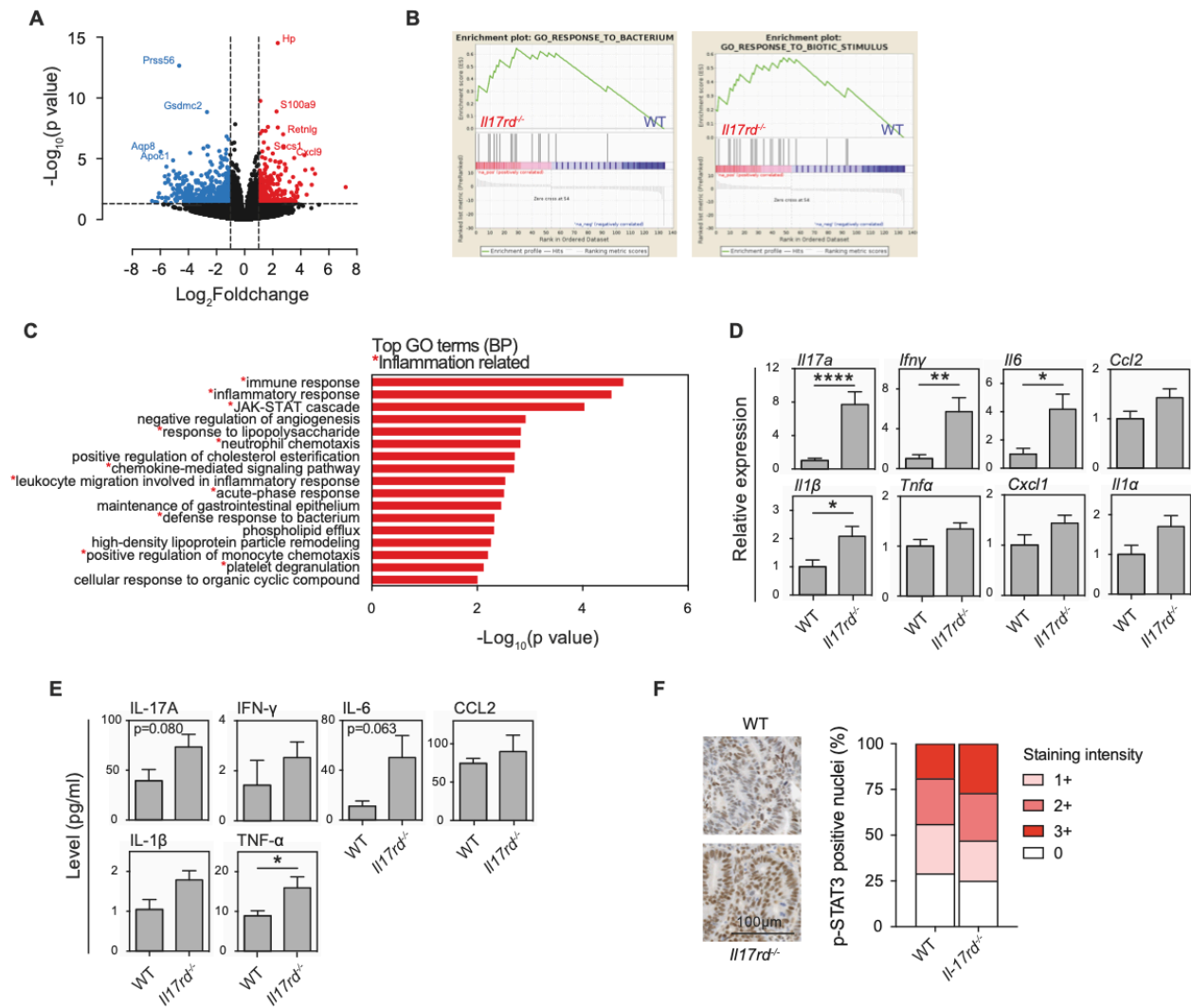


Figure 4. – Loss of IL-17RD exacerbates the inflammatory reaction in colitis-associated colorectal cancer. (A) Volcano plot displaying differentially expressed genes in colorectal tumors from WT and *Il17rd*^{-/-} mice following AOM-DSS treatment. Significantly downregulated and upregulated genes (fold change (FC) ≥ 1 with p adj < 0.05) are represented as blue and red dots, respectively. (B) GSEA of the two gene signatures with the highest enrichment score in *Il17rd*^{-/-} tumors. (C) GO enrichment analysis of differentially expressed genes showing the top 17 biological processes (BP)

enriched in *Il17rd*^{-/-} tumors ($p < 0.05$). (D) Relative expression of cytokines and chemokines mRNA levels in WT and *Il17rd*^{-/-} tumors was measured by qPCR. Data are means \pm SEM ($n = 10$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. (E) Circulating cytokine and chemokine protein levels were measured by ELISA. Data are means \pm SEM ($n = 5$). * $p < 0.05$. (F) Representative photomicrographs of colon tumors from WT and *Il17rd*^{-/-} mice stained with phospho-STAT3(Y705) (p-STAT3) antibody. Right, quantification of p-STAT3-positive cells using Visiomorph software ($n = 5$).

2.5.5 IL-17RD restrains DSS-induced colonic inflammation

The above observations prompted us to evaluate the impact of IL-17RD expression on DSS-induced colonic inflammation, which is critical for tumor promotion in the two-step AOM-DSS cancer model. For these experiments, mice were exposed to 2% DSS for 6 days and analyzed after 3 or 12 days of recovery. No difference in inflammation indicators, such as colon length or spleen weight, was observed at day 9 (Fig. 5A, B). However, at day 18, *Il17rd*^{-/-} mice exhibited slightly smaller colons and significantly larger spleens, as well as an increased colitis score, indicative of enhanced inflammation and intestinal damage (Fig. 5A-C). Histological analysis confirmed the more severe inflammation in *Il17rd*^{-/-} colons, evidenced by areas of inflammatory cell infiltration, ulceration and crypt damage (Fig. 5D). We also found that expression of *Il6* and *Il17a* genes is up-regulated in the colons of DSS-treated *Il17rd*^{-/-} mice as compared to wild type mice (Fig. 5E).

Interestingly, we also observed a reproducible and significant downregulation of IL-17RD mRNA expression in DSS-treated wild type mice at day 9 and day 18, suggesting a positive feedback loop potentially aggravating the inflammatory response (Fig. 5F). These results further support the role of IL-17RD as a suppressor of inflammation.

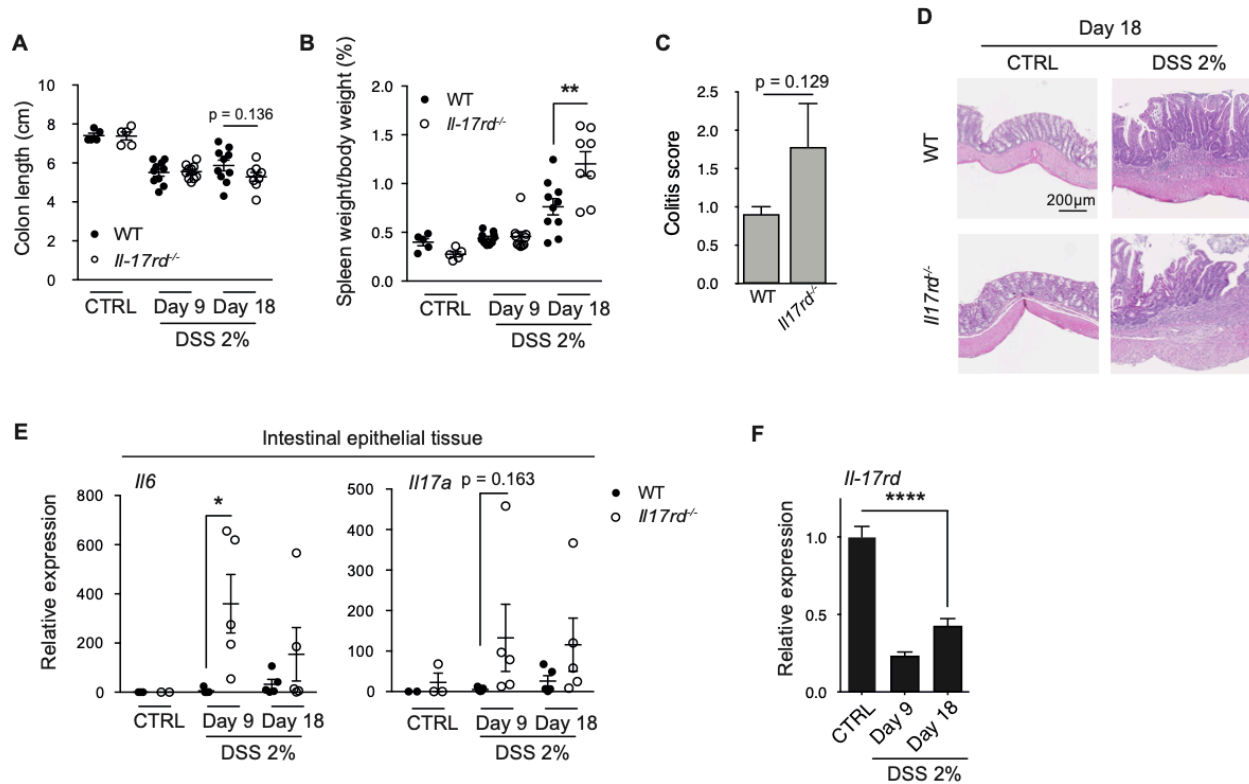


Figure 5. – IL-17RD expression restricts DSS-induced intestinal inflammation. (A) Measurement of colon length. Bar represents the mean value ($n \geq 5$). $**p < 0.01$. (B) Ratio of spleen weight to body weight. Bar represents the mean value ($n \geq 5$). $**p < 0.01$. (C) Macroscopic colitis score ($n \geq 5$). (D) Representative photomicrographs of H&E-stained colon sections 18 days after DSS treatment. Scale bar, 200 μm . (E) Relative expression of IL-6 and IL-17A mRNA levels in intestinal tissue of WT and *Il17rd*^{-/-} mice after DSS treatment. Bar represents the mean value \pm SEM ($n \geq 5$). $*p < 0.05$. (F) Relative expression of IL-17RD mRNA levels in intestinal tissue of WT mice following DSS treatment. Data are means \pm SEM ($n \geq 5$). $****p < 0.0001$.

2.5.6 Down-regulation of IL-17RD increases TLR and IL-17 signaling in colorectal cancer cells

Every gene set enrichment and pathway analysis performed (GSEA, GO term, IPA and KEGG) has documented the significant up-regulation of genes associated with TLR signaling, such as response to bacteria, response to lipopolysaccharide or Toll-like signaling pathway, in *Il17rd*^{-/-} colon tumors (Fig. 4B,C; S3B and S5A). An enrichment in IL-17 canonical signaling pathway was also revealed by IPA in these tumors (Fig. S5B). These findings are in agreement with two previous studies reporting an inhibitory role of IL-17RD expression on TLR signaling in macrophages and on IL-17A signaling in HeLa cells^{20,22}. To assess the role of IL-17RD on TLR and IL-17A signaling in the context of colorectal carcinogenesis, MC-38 cells were depleted of IL-17RD by siRNAs, and then stimulated with either LPS or IL-17A. Silencing of IL-17RD expression resulted in augmented expression of the NF-κB responsive genes *Il6* and *Cxcl2* upon LPS stimulation of MC-38 cells (Fig. 6A). Similarly, depletion of IL-17RD potentiated the induction of a panel of IL-17 responsive genes in response to IL-17A (Fig. 6B). The IL-17A-induced *Il6* gene expression was associated with a significant increase in IL-6 protein secretion in MC-38 cells (Fig. 6C). These results are consistent with an inhibitory role of IL-17RD on TLR and IL-17A signaling in colorectal cancer epithelial cells.

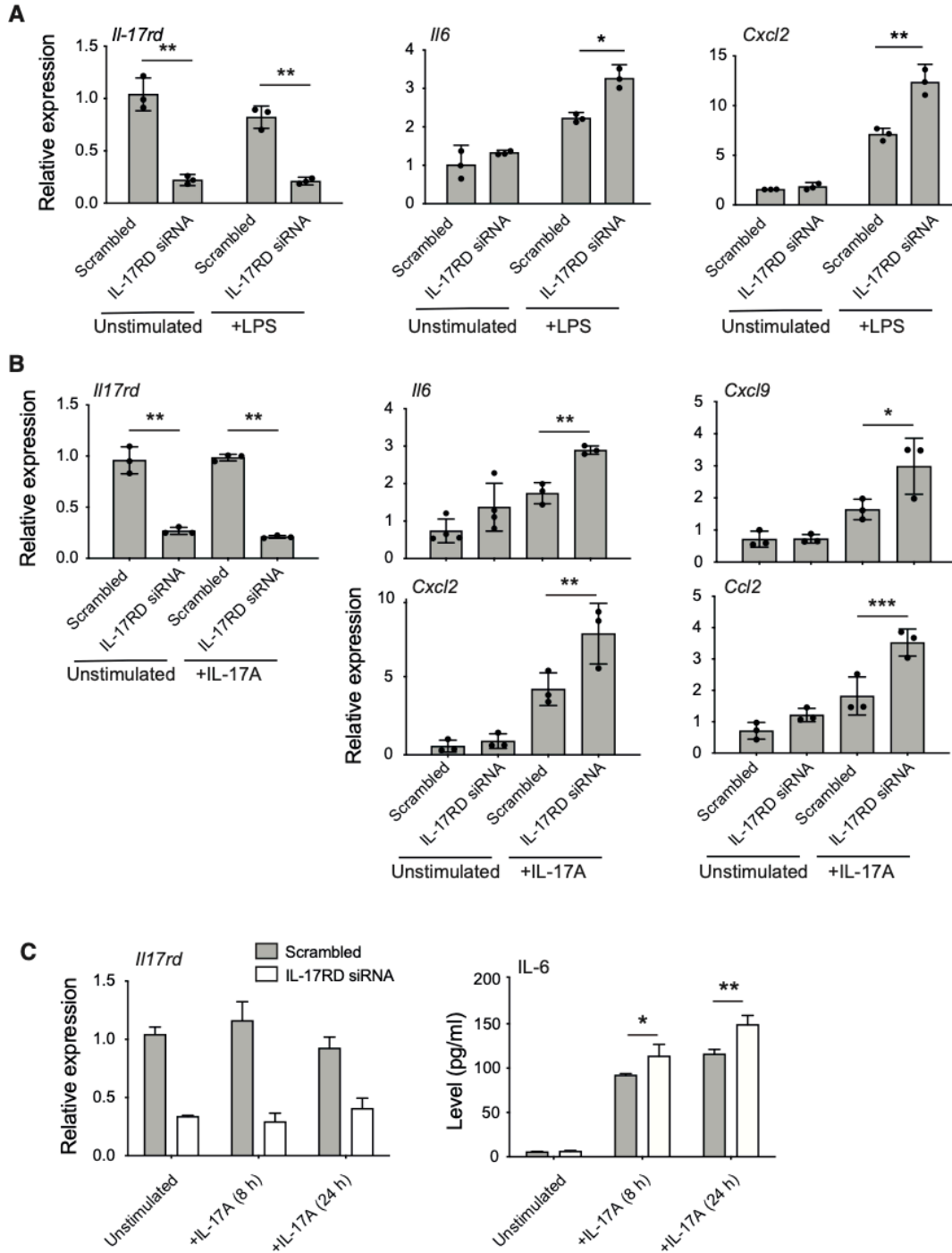


Figure 6. – Down-regulation of IL-17RD increases TLR and IL-17 signaling in colorectal cancer cells. (A) MC-38 cells were transfected with control or *Il17rd* pooled siRNAs, and then stimulated or not with LPS (100 ng/ml) for 6 h. Expression of NF- κ B gene targets was monitored by qPCR. Data are means \pm SD (n = 3). (B) Same as in A except that cells were stimulated with IL-17A (100 ng/ml) for 6 h. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. (C) MC-38 cells were stimulated with IL-17A for the indicated times.

Secreted IL-6 protein levels were measured by ELISA. Data are means \pm SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01.

2.6 Discussion

IL-17RD or SEF was originally identified as a feedback inhibitor of receptor tyrosine kinase-mediated ERK1/2 MAPK signaling in zebrafish and mammalian cells^{10,11,13,16}. Interestingly, analysis of tumor samples revealed that IL-17RD expression is down-regulated in a subset of human cancers, leading to the hypothesis that IL-17RD may exert tumor suppressor properties^{12,23,25,26,28}. Yet, the impact of IL-17RD deficiency on tumorigenesis *in vivo* has not been addressed. Here, we show that IL-17RD suppresses the development of spontaneous tumors in aging mice and the formation of colorectal tumors in a model of inflammation-associated carcinogenesis. Our study identifies *Il17rd* as a *bona fide* tumor suppressor in mice.

Despite the abundant literature on the role of IL-17RD as a negative regulator of mitogenic signaling and cell proliferation, we did not find evidence for a major role of IL-17RD in regulating the proliferation of colorectal epithelial cells. No change in proliferation was observed upon genetic inactivation of IL-17RD gene in the colonic epithelium of young mice, in AOM-DSS-induced colorectal tumors, or in human and mouse colorectal cancer cell lines. Moreover, we failed to observe any enrichment in cell division gene signatures in the transcriptome of colonic tumors from *Il17rd*^{-/-} mice. Among possible explanations for these apparently discrepant results are differences in phenotype conferred by gain-of-function and loss-of-function genetic perturbations, compensatory mechanisms leading to rewiring of mitogenic signaling pathways, and cell type- and/or context-specific role of IL-17RD.

There is now ample evidence for a critical role of chronic inflammation in the etiology of many cancers^{29,30}. This association is particularly notable in gastrointestinal cancers as epithelial cells are constantly exposed to irritants and pro-inflammatory factors from the gut microbiome³¹. Patients with inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, have an increased risk of developing colorectal cancer, which accounts for up to 10-15% of all-cause mortality³². Chronic gastrointestinal inflammation promotes cancer progression by increasing the production of pro-tumorigenic cytokines, mainly TNF α , IL-1, IL-6 and IL-17A, which activate NF- κ B and

STAT3 signaling pathways^{33,34}. Of note, previous studies have reported that IL-17RD negatively regulates TLR and IL-17A signaling in certain cell types, restraining the activation of NF- κ B and IRF3 and the expression of inflammatory genes^{19,20,34}. Consistent with these findings, we found that down-regulation of IL-17RD enhances the stimulation of cytokine and chemokine gene expression by LPS or IL-17A in colon adenocarcinoma epithelial cells. Most importantly, we showed that inactivation of IL-17RD markedly exacerbates the inflammatory response in AOM-DSS-induced colorectal tumors, illustrated by a strong enrichment in inflammation-related gene signatures, elevated expression of pro-inflammatory cytokines, and a slight increase in STAT3 tyrosine phosphorylation. Similarly, ablation of *Il17rd* resulted in the increased expression of *Il6* and *Il17a* genes in the intestinal tissue of mice treated with 1 cycle of DSS alone. We conclude from these results that IL-17RD acts as a negative regulator of inflammation signaling pathways in intestinal epithelial cells to self-limit the inflammatory response. The low or undetectable expression of IL-17RD mRNA in immune cells and the lack of phenotypic consequences of *Il17rd* deficiency on major immune cell subsets argues against a cell-autonomous role of the receptor in the development and/or expansion of immune cells.

IL-6 and IL-17A play a multifaceted and causative role in the promotion and progression of colitis-associated colorectal cancer^{9,34,35}. Genetic or pharmacological inhibition of IL-6 or IL-17A inhibits tumor growth and metastasis in mouse models of colorectal cancer. Higher levels of serum IL-6 and IL-17A are found in colorectal cancer patients and are associated with a poor outcome. Given the key role of these as well as other pro-inflammatory cytokines in cancer, it is tempting to speculate that the main mechanism by which IL-17RD suppresses tumorigenesis is by limiting the magnitude and duration of inflammation. This idea is further substantiated by our observation that aging *Il17rd*^{-/-} mice develop spontaneous tumors in association with a state of chronic inflammation.

In addition to the lack of knowledge on the pathophysiological roles of IL-17RD, the regulation of the receptor also remains understudied. Interestingly, we observed that

treatment with DSS induces a rapid and marked down-regulation of *Il17rd* gene expression, which is already detectable at day 9 after initiation of the DSS challenge and sustained for at least 18 days. This suggests that activation of innate immune signaling pathways and local expression of inflammatory mediators in intestinal epithelial cells represses *Il17rd* gene transcription, thereby establishing a positive feedback loop that further exacerbates inflammation and creates a tumor microenvironment conducive for tumor progression. Notably, we previously reported that expression of oncogenic Ras downregulates the level of IL-17RD in intestinal epithelial cells¹⁶. These observations suggest that early oncogenic events and pro-inflammatory cytokines can act individually or cooperatively to down-regulate IL-17RD and accelerate tumor progression. Intriguingly, down-regulation of *IL17RD* was not observed in a small cohort of ulcerative colitis patients³⁶. Interrogation of the TCGA and GTEx databases revealed that expression of IL-17RD mRNA is lower in colon adenocarcinomas as compared to normal adjacent tissue and normal intestinal mucosa (**Fig. 7A-B**). Specifically, *IL17RD* is significantly down-regulated in the microsatellite instability (MSI) subgroup of colorectal cancer patients. It is noteworthy that IL-6 can induce microsatellite instability in colorectal cancer epithelial cells, linking inflammation with genomic instability³⁴. The clinical significance of IL17-RD in inflammation-associated human cancers warrants further investigation.

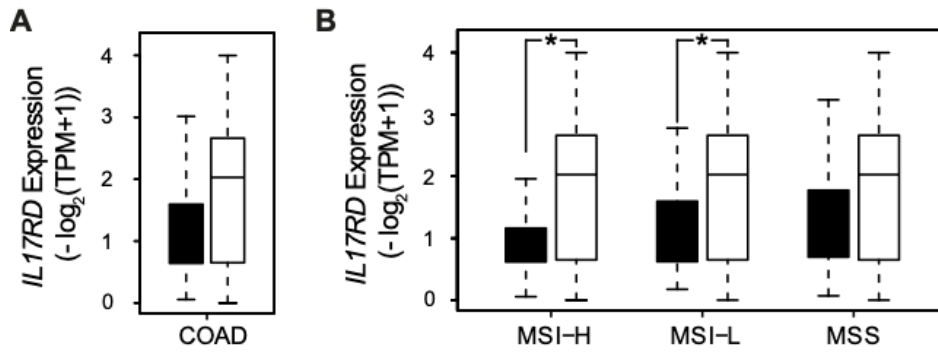


Figure 7. – *IL17RD* gene expression is down-regulated in human colorectal cancer. (A) Expression of *IL17RD* in colon adenocarcinoma (COAD) compared to matched TCGA normal tissue and GTEx normal colon tissue. (B) Expression of *IL17RD* in colon adenocarcinoma subtypes compared to matched TCGA normal tissue and GTEx normal colon tissue.

2.7 Methods

2.7.1 Reagents and antibodies

Azoxymethane (AOM; catalog # A5486) was purchased from Sigma-Aldrich. Dextran sulfate sodium (DSS; catalog # DB001) with molecular weight 40 kDa was from TdB labs, lipopolysaccharide (LPS) from InvivoGen (catalog # tlr1-pek1ps), and mouse recombinant IL-17A from R&D Systems (catalog # 7956-ML/CF). Commercial antibodies were obtained from the following suppliers and used at the indicated concentrations. Antibodies for immunoblotting: phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204) (1/2,000; #4370) and ERK1/2 (1/1,000; #4695) from Cell signaling Technology, and HSC70 (1/2,000; sc-7298) from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies for immunochemistry (IHC): Ki67 (1/100; #CRM325A), cleaved caspase-3 (1/100; #CP229B) and CD31 (1/50; #CM303A) from Biocare Medical, phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204) (1/400; #4370) and phospho-STAT3(Y705) (1/150; #9131) from Cell signaling Technology.

2.7.2 Mice

Il17rd mutant mouse has been described³⁷. The mice were backcrossed for more than 10 generations to the C57BL/6J genetic background to establish a congenic strain. All mice were bred under standard conditions at the Institute for Research in Immunology and Cancer. The mice were housed under specific pathogen-free conditions in filter-topped isolator cages under a 12/12 hour light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. Animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the relevant local animal welfare agencies, and all experiments were approved by the Canadian Council on Animal Care (CCAC).

For the longitudinal study of aging mice, male and female animals were sacrificed at the indicated time points. Body weight was recorded, and a complete necropsy was performed at the time of sacrifice. Tissues from different organs were harvested for further protein expression, mRNA expression and IHC analysis.

2.7.3 AOM-DSS model of colitis-associated colorectal tumorigenesis and DSS model of colitis

Female and male mice were used at 12 weeks of age. Mice were injected intraperitoneally with 10 mg of AOM per kg body weight, according to previously established protocols²⁷. After 14 days, 2% DSS was administered in the drinking water for 7 days, followed by regular water until sacrifice 84 days after AOM injection. Body weight was recorded during the AOM-DSS protocol. At the time of sacrifice, the entire colon was excised, flushed with PBS, and the length measured using a digital caliper. The colon was cut longitudinally, and tumor burden was assessed by measuring the number and size of macroscopic tumors with a caliper. The colon was then fixed and processed for histopathological analysis. A colitis score was calculated based on weight loss, stool consistency and rectal bleeding. Scores for weight loss were assigned as follow: 0=loss of 0-1% of body weight, 1=loss of 1-5% of body weight, 2=loss of 5-10% of body weight, 3=loss of 10-20% of body weight, 4=loss of >20% of body weight. Scores for stool consistency were: 0=normal, 2=loose, 4=diarrhea. Scores for bleeding were: 0=no bleeding, 1= hemo positive, 4=bleeding anus.

For short-term DSS-induced colitis study, 8-12 week-old female mice were administered 2% DSS for 6 days in drinking water and sacrificed at the indicated time points. Body weight, spleen weight and colitis score were determined as described above.

2.7.4 Histology and IHC

Organs were fixed for at least 24 h in 10% formalin, processed and embedded in paraffin by standard techniques. Paraffin-embedded sections of 4 μ m were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined by a pathologist blinded to the experimental groups for tumor identification (longitudinal aging cohort), tumor grade, epithelial damage and inflammation (AOM-DSS and DSS protocols).

IHC staining was carried out on paraffin-embedded formalin-fixed samples using the automated Bond RX staining platform (Leica Biosystems). Tissue sections were

deparaffinised in xylene and hydrated in serial alcohol solutions. Antigen recovery was performed by heat-induced epitope retrieval using BOND Epitope Retrieval Solution 1 or 2 (Leica Biosystems). The slides were incubated with 150 μ L of primary antibody for 30 min at room temperature. Bound antibodies were detected using the corresponding secondary biotin-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch) with either Bond Polymer DAB Refine kit (#DS9800, Leica Biosystems) or Bond Intense R Detection System (#DS9263, Leica Biosystems). Slides were counterstained automatically with hematoxylin included in the detection kit. IHC staining of Ki67 was performed on the automated Discovery XT staining platform (Ventana Medical Systems). Antigen recovery was performed by heat-induced epitope retrieval using standard CC1 solution (Ventana Medical Systems). The slides were incubated with 100 μ L of anti-Ki67 antibody for 2 h, followed by detection with biotin-conjugated rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch) and DABmap detection kit (Ventana Medical Systems). IHC staining was quantified using the Visiormorph software (Visiopharm).

2.7.5 Flow cytometry

Thymi, spleens and skin-draining lymph nodes were pressed through a 70 μ m cell strainer (Thermo Fisher Scientific). Spleen cell suspensions were treated with NH₄Cl to lyse red blood cells. For all tissues, live cells were counted using trypan-blue exclusion, and single cell suspensions were stained extracellularly with combinations of the following antibodies, listed as “target (clone; dyes)”. CD45 (30-F11, PE-Cy7), CD4 (RM4-5, BV786), CD8 α (53-6.7, FITC), CD11b (M1/70, Pacific Blue) CD19 (6D5, Alexa Fluor 700), TCR β (H57-597, BV711), CD69 (H1.2F3, PE) were all purchased from Biolegend. The viability dye (fixable yellow dead cell stain kit) were purchased from eBioscience. All antibodies were titrated for optimal use. Cells were incubated with antibodies at 4°C for 30 minutes and washed twice prior to data acquisition on flow cytometers. Data were collected using Becton Dickinson instruments, namely a LSR-Fortessa X20 and analyzed using Flow-Jo software (FlowJo LLC).

2.7.6 Intestinal organoid culture

Intestinal crypts were isolated from the jejunum of 4-month-old mice with 30 mM EDTA as described previously³⁸. Organoids were cultured in Advanced DMEM/F-12 culture media (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 50 ng/mL murine EGF (Life Technologies), 1 mM N-acetylcysteine (Sigma-Aldrich), B27 supplement 1X (Life Technologies), N2 supplement 1X (Life Technologies), 10% R-spondin and 5% Noggin conditioned media and passaged as described³⁹. Noggin-Fc and R-spondin-Fc conditioned media were produced from HEK 293T cell lines stably expressing R-spondin 1-Fc (kindly provided by C. Kuo, Stanford University, USA) or Noggin-Fc (kindly provided by G.R. van den Brink, Hubrecht Institute, The Netherlands). Organoid protrusions were counted using a Zeiss Axiovert 200 M inverted microscope. Phase-contrast images were taken with a Zeiss Celldiscoverer 7 live cell imaging station. Cell proliferation was assayed by incubation with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for 1 h, followed by fixation with 4% paraformaldehyde and EdU detection using the Click-it EdU Alexa Fluor 555 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Actively proliferating cells were visualized with a confocal microscope (Zeiss LSM 880).

2.7.7 Cell culture

HCT 116 cell line was obtained from the American Type Culture Collection. MC-38 cells were obtained from Kerafast. The cells were cultured in DMEM media supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. The cells were used at low passages and routinely tested for mycoplasma contamination.

2.7.8 Real time quantitative PCR

Total RNA was isolated using the RNeasy isolation kit (Qiagen) and converted to cDNA using the Maxima first-strand cDNA synthesis kit with dsDNase (Thermo Fisher Scientific). Gene expression was measured using assays designed for the Universal

ProbeLibrary system⁴⁰ as described⁴¹. Primer sequences are listed in Supplementary Table 1.

2.7.9 Cytokine array and ELISA

Serum samples were collected at the end of AOM-DSS treatment and analyzed using a multiplex cytokine array (Eve Technologies, Calgary, Canada). Secreted levels of IL-6 in MC-38 culture medium were measured by ELISA (R&D Systems #DY406-05).

2.7.10 Immunoblotting

Cell lysis and immunoblotting analysis were performed as described previously¹⁶.

2.7.11 RNA interference

Cells were transfected with 100 nM of SMARTpool ON-Target Plus siRNAs against mouse or human IL-17RD (L-065001-01-0005 or L-007946-02-0005, Dharmacon) using Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies). All transfections were carried out according to the manufacturer's protocol.

2.7.12 Cell proliferation assay

Cell proliferation were measured by the WST1 assay⁴⁰ according to the manufacturer's instructions.

2.7.13 Transcriptomic analysis

Tumors were micro-dissected from AOM-DSS treated wild type and *Il17rd*^{-/-} colons. Total RNA was isolated using the RNeasy purification kit (Qiagen) and the quality was assessed on the Agilent 2100 BioAnalyzer. Libraries (400 ng total RNA) were prepared using the KAPA Hyperprep Stranded mRNA-Seq Kit (KAPA Biosystems). cDNA fragments were ligated to indexed library adapters (Illumina) prior to PCR amplification (10 cycles). Purified libraries were normalized by qPCR using the KAPA Library

Quantification Kit (KAPA Biosystems) and diluted to a final concentration of 10 nM. The libraries were pooled and sequenced on the Illumina NextSeq500 using the Nextseq HighOutput v2 Kit (75 cycles, single-end) and the pooled library at 2 pM. Between 21 to 25 million single-end reads were generated per sample. Library preparation and sequencing was made at the Institute for Research in Immunology and Cancer core genomics facility. RNA-seq reads were aligned to the mouse reference genome (version GRCm38/mm10, gene annotation from Gencode version M13 based on Ensembl 88) with the STAR aligner. Read counts were normalized to reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) and differential gene expression was calculated with DESeq2 using the RNA Express software suite (Illumina). GO term and KEGG pathway enrichment analysis was performed using the DAVID suite of bioinformatics tools. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)⁴² was executed on the Broad Institute platform (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) using the annotated gene sets from the Molecular Signatures Database⁴³. Additional pathway analysis was performed with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Qiagen).

2.7.14 Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with GraphPad Prism 8.0. Values are reported as mean \pm SEM or SD as indicated. A two-tailed Student's t test was applied when comparing two experimental groups. The p value is indicated on the figures or in the legend. Survival curves were generated by the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.

2.8 Acknowledgements

We thank C. Kuo and G.R. van den Brink for reagents, J. Hinsinger for histology, L. Gaboury for pathology assistance, P. Melançon for qPCR analysis, J. Huber for RNA-seq, and P. Gendron for help with bioinformatic analyses. C.G. is recipient of a studentship from the Fonds de recherche Santé Québec. S.M. held the Canada Research Chair in Cellular Signaling. Work in the Meloche laboratory was supported by a grant from the Cancer Research Society.

2.9 References

1. Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(4).
2. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):479-489.
3. Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends Mol Med.* 2016;22(3):230-241.
4. Wang K, Kim MK, Di Caro G, et al. Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity.* 2014;41(6):1052-1063.
5. Hurtado CG, Wan F, Housseau F, Sears CL. Roles for Interleukin 17 and Adaptive Immunity in Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2018;155(6):1706-1715.
6. Razi S, Baradaran Noveiry B, Keshavarz-Fathi M, Rezaei N. IL-17 and colorectal cancer: From carcinogenesis to treatment. *Cytokine.* 2019;116:7-12.
7. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009;15(9):1016-1022.
8. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):556-567.
9. Su Y, Huang J, Zhao X, et al. Interleukin-17 receptor D constitutes an alternative receptor for interleukin-17A important in psoriasis-like skin inflammation. *Sci immunol.* 2019;4(36).
10. Tsang M, Friesel R, Kudoh T, Dawid IB. Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol.* 2002;4(2):165-169.

11. Furthauer M, Lin W, Ang SL, Thisse B, Thisse C. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol.* 2002;4(2):170-174.
12. Ron D, Fuchs Y, Chorev DS. Know thy Sef: a novel class of feedback antagonists of receptor tyrosine kinase signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(10):2040-2052.
13. Kovalenko D, Yang X, Nadeau RJ, Harkins LK, Friesel R. Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem.* 2003;278(16):14087-14091.
14. Ren Y, Cheng L, Rong Z, et al. hSef co-localizes and interacts with Ras in the inhibition of Ras/MAPK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(4):988-993.
15. Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell.* 2004;7(1):33-44.
16. Duhamel S, Hebert J, Gaboury L, et al. Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation. *Cancer Res.* 2012;72(3):626-635.
17. Ren Y, Cheng L, Rong Z, et al. hSef potentiates EGF-mediated MAPK signaling through affecting EGFR trafficking and degradation. *Cell Signal.* 2008;20(3):518-533.
18. Peng DH, Kundu ST, Fradette JJ, et al. ZEB1 suppression sensitizes KRAS mutant cancers to MEK inhibition by an IL17RD-dependent mechanism. *Sci Transl Med.* 2019;11(483).
19. Fuchs Y, Brunwasser M, Haif S, et al. Sef is an inhibitor of proinflammatory cytokine signaling, acting by cytoplasmic sequestration of NF-kappaB. *Dev Cell.* 2012;23(3):611-623.

20. Mellett M, Atzei P, Bergin R, et al. Orphan receptor IL-17RD regulates Toll-like receptor signalling via SEFIR/TIR interactions. *Nat Commun.* 2015;6:6669.
21. Rong Z, Wang A, Li Z, et al. IL-17RD (Sef or IL-17RLM) interacts with IL-17 receptor and mediates IL-17 signaling. *Cell Research.* 2008;19(2):208-215.
22. Mellett M, Atzei P, Horgan A, et al. Orphan receptor IL-17RD tunes IL-17A signalling and is required for neutrophilia. *Nat Commun.* 2012;3:1119.
23. Darby S, Murphy T, Thomas H, et al. Similar expression to FGF (Sef) inhibits fibroblast growth factor-induced tumourigenic behaviour in prostate cancer cells and is downregulated in aggressive clinical disease. *Br J Cancer.* 2009;101(11):1891-1899.
24. He Q, Gong Y, Gower L, Yang X, Friesel RE. Sef Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *J Cell Biochem.* 2016;117(10):2346-2356.
25. Darby S, Sahadevan K, Khan MM, Robson CN, Leung HY, Gnanapragasam VJ. Loss of Sef (similar expression to FGF) expression is associated with high grade and metastatic prostate cancer. *Oncogene.* 2006;25(29):4122-4127.
26. Zisman-Rozen S, Fink D, Ben-Izhak O, et al. Downregulation of Sef, an inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling, is common to a variety of human carcinomas. *Oncogene.* 2007;26(41):6093-6098.
27. Parang B, Barrett CW, Williams CS. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol.* 2016;1422:297-307.
28. Murphy T, Darby S, Mathers ME, Gnanapragasam VJ. Evidence for distinct alterations in the FGF axis in prostate cancer progression to an aggressive clinical phenotype. *J Pathol.* 2010;220(4):452-460.
29. Taniguchi K, Karin M. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(5):309-324.

30. Furman D, Campisi J, Verdin E, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019;25(12):1822-1832.
31. Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Strober W. Chronic inflammation and the development of malignancy in the GI tract. *Trends Immunol.* 2015;36(8):451-459.
32. Stidham RW, Higgins PDR. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg.* 2018;31(3):168-178.
33. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):329-342.
34. West NR, McCuaig S, Franchini F, Powrie F. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(10):615-629.
35. Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol.* 2014;26(1):54-74.
36. Pekow J, Meckel K, Dougherty U, et al. miR-193a-3p is a Key Tumor Suppressor in Ulcerative Colitis-Associated Colon Cancer and Promotes Carcinogenesis through Upregulation of IL17RD. *Clin Cancer Res.* 2017;23(17):5281-5291.
37. He Q, Yang X, Gong Y, et al. Deficiency of Sef is associated with increased postnatal cortical bone mass by regulating Runx2 activity. *J Bone Miner Res.* 2014;29(5):1217-1231.
38. Gonneaud A, Jones C, Turgeon N, et al. A SILAC-Based Method for Quantitative Proteomic Analysis of Intestinal Organoids. *Sci Rep.* 2016;6:38195.
39. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459(7244):262-265.
40. Loo YM, Fornek J, Crochet N, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol.* 2008;82(1):335-345.
41. Soulez M, Saba-El-Leil MK, Turgeon B, et al. Reevaluation of the Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase 3 in Perinatal Survival and Postnatal

- Growth Using New Genetically Engineered Mouse Models. *Mol Cell Biol.* 2019;39(6).
42. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005;102(43):15545-15550.
 43. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics.* 2011;27(12):1739-1740.

2.10 Additional Information

2.10.1 Supplementary Figures

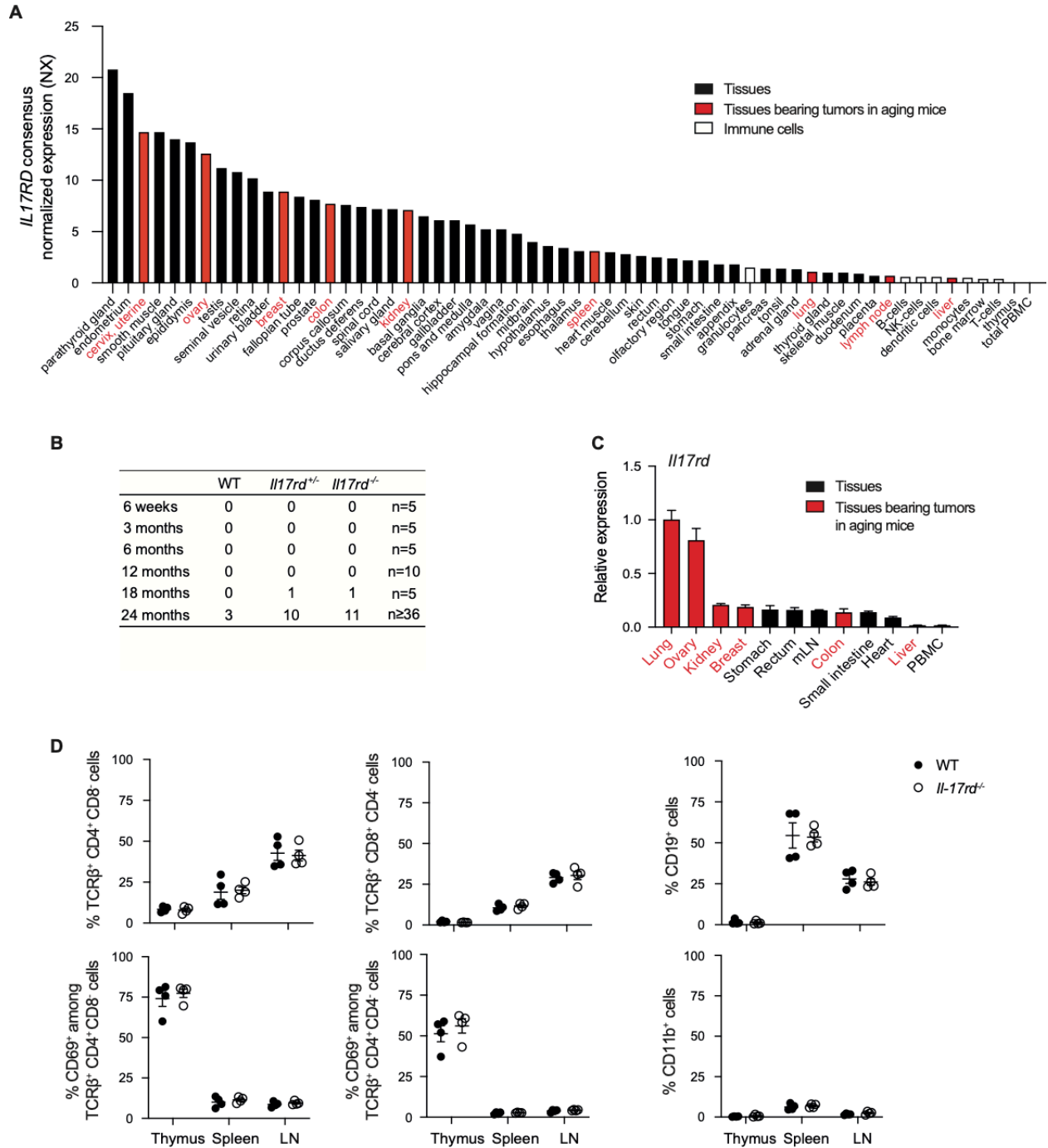


Figure S1. – Age-related tumor formation in *Il17rd* mutant mice. (A) Consensus normalized expression levels (NX) combining the data of three transcriptomics datasets (HPA, Gtexp and

FANTOM5) using the internal normalization pipeline from the Human Protein Atlas. (B) Incidence of spontaneous tumors in WT, *Il17rd^{+/-}* and *Il17rd^{-/-}* mice at different ages. (C). Relative expression of *Il-17rd* mRNA levels in a variety of tissues and blood cells from WT mice was measured by qPCR. Data are means \pm SEM (n = 3). (D). Immunophenotypic distribution in the thymus, spleen and skin draining lymph nodes of WT and IL17RD KO mice. Each dot represents one mouse, and bars represent the mean \pm S.D. Shown are frequency of CD4⁺ T cells (CD4⁺CD8⁻TCR β ⁺), CD8⁺ T cells (CD4⁻CD8⁺TCR β ⁺), B cells (CD45⁺CD19⁺) and myeloid cells (CD45⁺ CD11b⁺) as well as the frequency of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells (described as CD69⁺ cells among CD4⁺CD8⁻TCR β ⁺ or CD4⁻CD8⁺TCR β ⁺).

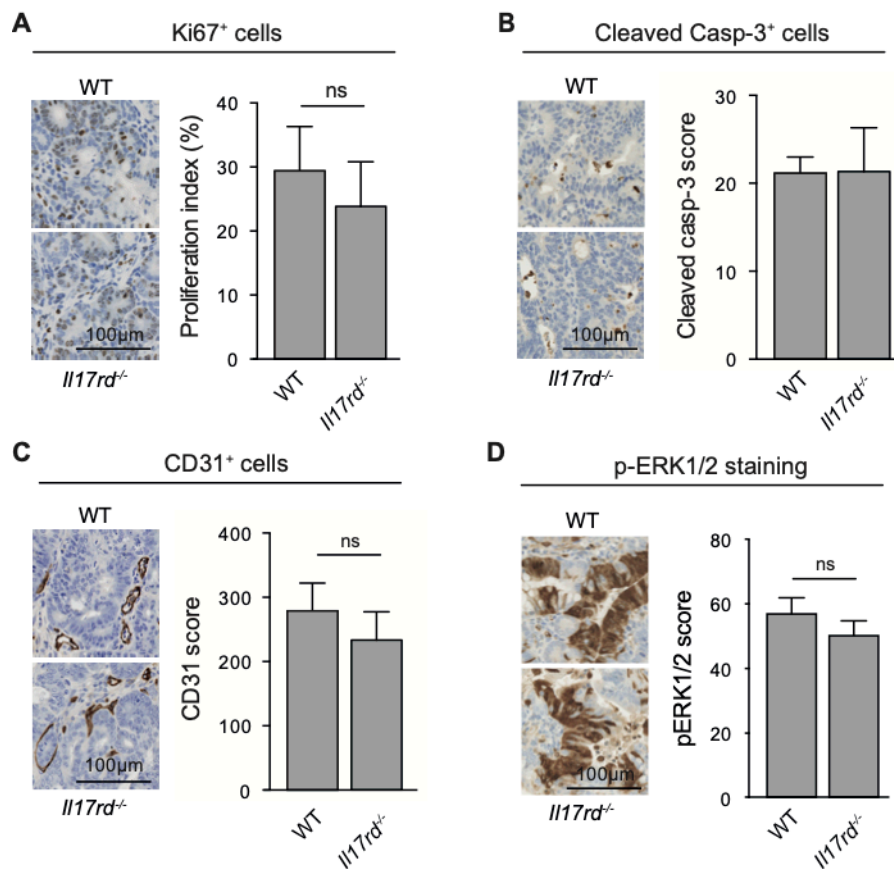


Figure S2. – Effect of IL-17RD deficiency on tumor cell proliferation, apoptosis and angiogenesis. Representative photomicrographs of colon tumors from WT and *Il17rd^{-/-}* mice stained for Ki67 (A), cleaved caspase-3 (B), CD31 (C) and phospho-ERK1/2 (D). Right panels, quantification of IHC data using Visiormorph software (n = 5). ns, not significant (p > 0.05).

A

Gene set	NES	NOM p-val	FDR
GO_RESPONSE_TO_BACTERIUM	2.32	0.000	0.013
GO_RESPONSE_TO_BIOTIC_STIMULUS	2.28	0.000	0.008
GO_IMMUNE_RESPONSE	2.25	0.000	0.009
GO_INFLAMMATORY_RESPONSE	2.19	0.002	0.012
GO_DEFENSE_RESPONSE_TO_OTHER_ORGANISM	2.14	0.000	0.012
GO_DEFENSE_RESPONSE	2.10	0.000	0.017
GO_EXTRACELLULAR_SPACE	2.09	0.002	0.016
GO_RESPONSE_TO_EXTERNAL_STIMULUS	2.08	0.003	0.016
GO_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	2.06	0.002	0.017
GO_RECEPTOR_BINDING	2.01	0.002	0.022
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_RESPONSE_TO_STIMULUS	1.93	0.005	0.035
MODULE_46	1.92	0.004	0.033
MODULE_75	1.92	0.004	0.032
GO_REGULATION_OF_RESPONSE_TO_STRESS	1.70	0.018	0.124
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_PROTEIN_METABOLIC_PROCESS	1.65	0.025	0.154
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_COMMUNICATION	1.63	0.048	0.159
MODULE_117	1.56	0.049	0.220
GO_LOCOMOTION	1.54	0.054	0.227

B

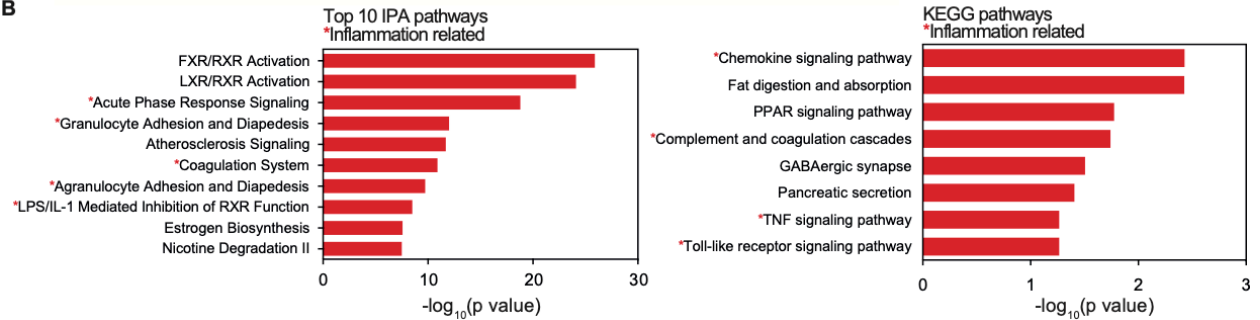


Figure S3. – Gene enrichment and pathway analysis of the transcriptomes of wild type and *Il17rd*^{-/-} colon tumors. (A) GSEA. Normalized enrichment scores of the top signatures (FDR < 0.25) enriched in genes upregulated in *Il17rd*^{-/-} tumors. (B) IPA and KEGG pathway analysis.

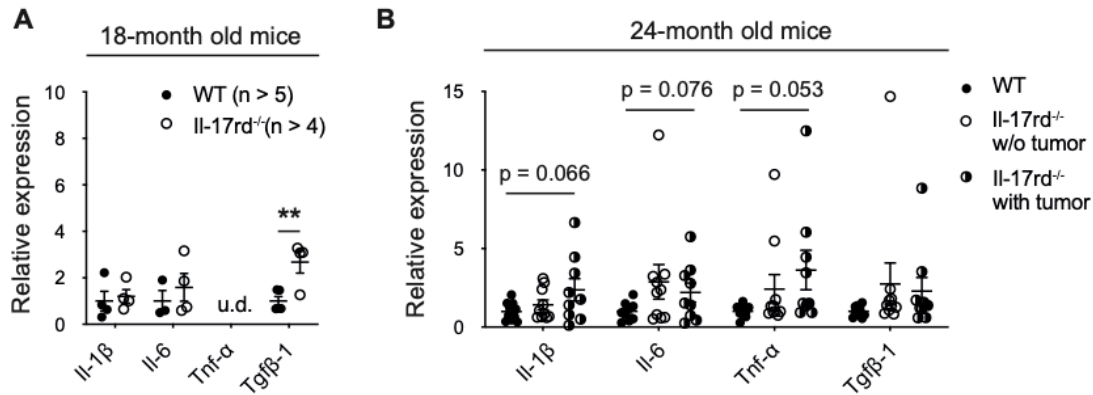


Figure S4. – Loss of IL-17RD leads to chronic inflammation in aging mice. Relative mRNA expression levels of selected cytokines in the intestinal tissue of wild type and *Il17rd^{-/-}* mice measured by qPCR at 18 months (A) and 24 months (B) of age. Data are means \pm SEM (n = 10 for wild type, n=20 for *Il17rd^{-/-}* mice). *p < 0.05, **p < 0.01.

A

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Molecules
LPS-stimulated MAPK Signaling	0,00	LBP
Toll-like Receptor Signaling	1,48E00	IL33,IL1A,IL36G,IL36A,LBP

B

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Molecules
IL-17A Signaling in Gastric Cells	1,7E00	CXCL10,CCL5,IL17A
IL-17 Signaling	1,69E00	CXCL10,MMP3,CRP,NOS2,IL17F,IL17A

Figure S5. – Loss of IL-17RD promotes TLR and IL-17A signaling in colitis-associated colorectal cancer. (A) IPA showing the enrichment of TLR signaling gene signatures in tumors from *Il17rd^{-/-}* mice. (B) IPA showing the enrichment of IL-17A signaling gene signatures in tumors from *Il17rd^{-/-}* mice.

2.10.2 Supplementary Table

Tableau 1. – List of primer sequences used for qPCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Il17rd</i>	CTTCAGGCGGAGGACTTG	CCCTGGAGAAACGTTTTGG
<i>Il17a</i>	GATTTTCAGCAAGGAATGTGG	CATTGTGGAGGGCAGACAAT
<i>Il6</i>	GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
<i>Il1b</i>	AGTTGACGGACCCCAAAG	AGCTGGATGCTCTCATCAGG
<i>Tnf</i>	TCTTCTCATTCTGCTTGTGG	GGTCTGGGCCATAGAAGTGA
<i>Tgfb1</i>	TGGAGCAACATGTGGAAGT	GTCAGCAGCCGGTTACCA
<i>Cxcl2</i>	CCTGGTTCAGAAAATCATCCA	CTTCCGTTGAGGGACAGC
<i>Cxcl9</i>	CGGACTTCACTCCAACACAG	GCATTCCTTATCACTAGGGTTCC
<i>Ccl2</i>	CTTCTGGGCCTGCTGTTC	GTGGGGCGTTAACTGCAT
<i>Csf2</i>	GCATGTAGAGGCCATCAAAGA	CGGGTCTGCACACATGTTA
<i>Ifng</i>	ATCTGGAGGAACTGGCAAAA	TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGGTA
<i>Cxcl1</i>	TTTTGTATGTATTAGGGTGAGGACAT	GCGTGTTGACCATACAATATGAA
<i>Il10</i>	CAGCCGGAAGACAATAACT	GTTGTCCAGCTGGTCCTTTG
<i>Il1a</i>	CCATAACCCATGATCTGGAAG	TTGGTTGAGGGAATCATTAT
<i>Ccl7</i>	AGGATCTCTGCCACGCTTC	TTGACATAGCAGCATGTGGAT
<i>Cox2</i>	CATCTGAAGACGTCCTCCACTCAT	TGCTTGATTTAGTCGGCCTGGGAT
<i>Cxcl12</i>	CCAAACTGTGCCCTTCAGAT	ATTCGGGTCAATGCACACT
<i>Il23a</i>	CACCTCCCTACTAGGACTCAGC	TCAGGCTGGGCATCTGTT
<i>Vegfa</i>	TGATCAGACCATTGAAACCACT	GGAAGGGTAAGCCACTCACA
<i>Il22</i>	GCAAGCTTGAGGTGTCCAAC	AGCCGGACATCTGTGTTGTT
<i>Gapdh</i>	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
<i>Hprt</i>	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC

Chapitre 3

3 Le système immunitaire inné de reconnaissance des acides nucléiques cytoplasmiques

Les acides nucléiques sont des transporteurs d'information génétique essentiels à tout organisme vivant. Ils sont présents chez les pathogènes viraux, bactériens, et eucaryotes et font partie des structures majeures détectées par le système immunitaire inné. Les PRRs qui reconnaissent les acides nucléiques dans la cellule incluent certains membres des TLRs endosomaux (**Chapitre 1, section 1.3.1.1, page 29**) et plusieurs récepteurs cytosoliques à ADN et ARN.

En effet, les récepteurs de l'immunité innée pour les acides nucléiques sont généralement divisés en deux groupes sur la base de leur localisation cellulaire et de leur profil d'expression. Le premier groupe comprend plusieurs membres de la famille des TLRs qui fonctionnent majoritairement dans les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B. Ces TLRs sont localisés à la membrane des endosomes et surveillent la lumière des endosomes et lysosomes pour détecter des formes variées d'acides nucléiques de bactéries et de virus. Le deuxième groupe de récepteurs, qui n'a été bien caractérisé que récemment, détecte les acides nucléiques dans le cytoplasme de presque tous les types cellulaires. Ces récepteurs d'acides nucléiques comprennent principalement les protéines qui détectent l'ADN cytoplasmique ainsi que les récepteurs de type RIG-I (RLRs) qui détectent les ARNs dérivés de pathogènes dans le cytosol. Suite à la reconnaissance d'acides nucléiques, les TLRs des endosomes et les récepteurs cytosoliques recrutent des protéines adaptatrices qui activent des cascades de signalisation NF- κ B, et de facteurs de régulation des interférons IRF3, et IRF7 qui induisent la production de cytokines pro-inflammatoires (p. ex., TNF- α et IL-1 β) et d'IFNs de type I (p. ex., IFN- α , IFN- β), respectivement.

3.1 La reconnaissance des ARNs viraux cytoplasmiques

Le domaine de liaison aux ARNs viraux sur les TLRs (p. ex., TLR3) fait face à la lumière de l'endosome. Ainsi, ces TLRs sont insensibles aux virus à ARN qui ont réussi à envahir le cytoplasme et qui se répliquent dans la cellule¹. De plus, la plupart des cellules non immunitaires, telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes présents à la surface de la muqueuse et qui sont ainsi les plus exposés à une infection, n'expriment pas de TLRs sensibles aux acides nucléiques. Néanmoins, elles sont capables d'initier une réponse immunitaire innée efficace contre des infections microbiennes. Par conséquent, un système de surveillance cytoplasmique intrinsèque à la cellule est nécessaire pour permettre aux cellules immunitaires et aux cellules non immunitaires de se défendre contre de potentiels envahisseurs.

3.1.1 RIG-I et MDA5, des récepteurs cytoplasmiques pour les ARNs viraux

Le PAMP principal des virus à ARN responsable de la réponse IFN de type I est l'ARN viral délivré directement dans la cellule sous forme de génome viral entrant ou sous forme d'intermédiaires de réplication d'ARN viral. Les caractéristiques moléculaires de l'ARN pour la reconnaissance par RIG-I reposent sur un groupe triphosphate à son extrémité 5' ^{9,10}, une caractéristique absente chez les ARNm de l'hôte, permettant ainsi une discrimination entre le soi et le non-soi.

Parmi les différents récepteurs aux ARNs, les hélicases à RNA DExD/H-box de la famille des RLRs ont été identifiés comme les récepteurs essentiels aux virus à ARN. On compte parmi ces membres des RLRs, la protéine du gène I inductible par l'acide rétinoïque (RIG-I) et son homologue la protéine 5 associée à la différenciation des mélanomes (MDA5) ainsi que le LGP2 ², RIG-I étant le membre fondateur de la famille des RLRs³. Les trois RLRs partagent plusieurs domaines hautement conservés, dont un noyau central composé du domaine hélicase DExD/H-box et un domaine c-terminal (CTD), tous les deux requis pour la liaison à l'ARN^{2,4}. De plus, le domaine N-terminal de RIG-I et MDA5 est composé de deux domaines de recrutement et d'activation de la

caspase (CARDs) qui permettent la transmission de la signalisation aux protéines adaptatrices en aval^{1,5,6}. L'absence de domaines CARDs dans le domaine N-terminal de LGP2 lui confère un rôle controversé dans la littérature. En effet, il a d'abord été rapporté que LGP2 pouvait être un inhibiteur de la signalisation RLR³, alors que de récents travaux ont démontré son rôle positif dans la signalisation MDA5^{7,8}.

Alors que RIG-I et MDA5 sont tous deux des récepteurs à ARN double brin (ARNdb), la différence de reconnaissance des virus par RIG-I et MDA5 est attribuée à leur préférence distincte pour des ligands à ARN de tailles différentes. De long fragments (> 4kb) sont reconnus préférentiellement par MDA5, alors que de plus courts fragments générés par digestion enzymatique (~300pb) sont reconnus par RIG-I¹¹. Ainsi, RIG-I est capable de reconnaître des virus de la famille des Paramyxoviridae, tel que le virus Sendai (SeV), de la famille des Flavaviridae, le virus de l'hépatite C (HCV) ou le virus de l'encéphalite Japonaise (JEV)⁴, ainsi que de la famille des Rhadoviridae, tel que le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), mais aussi du virus de la grippe A^{1,12-14}. MDA5 détecte les virus de la famille des Picornaviridae, tel que le virus de la Polio et le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV)^{13,15}. Certains virus tels que le Reovirus, le virus de la Dengue et le virus du Nil occidental (WNV) sont reconnus par les deux récepteurs RIG-I et MDA5^{14,16}.

En l'absence de ligand, RIG-I adopte une conformation « fermée » auto-inhibée qui prévient la signalisation induite par ses domaines CARDs¹⁷⁻¹⁹. Cependant, suite à une infection virale, la liaison de l'ARNdb au domaine CTD induit un changement conformationnel de RIG-I qui libère les domaines CARDs ainsi disponibles pour la transmission du signal^{17,20,21}. En effet, les E3 ligases TRIM25 et Riplet (aussi appelée RNF135 ou REUL) sont alors capables d'ajouter des chaînes de polyubiquitine de type K63 aux domaines CARDs de RIG-I²²⁻²⁵, induisant la formation de complexes composés de quatre protéines RIG-I et quatre chaînes d'ubiquitine, très puissants pour induire la signalisation en aval^{5,26}. Parallèlement, suite à la reconnaissance d'ARNdb par MDA5, les protéines MDA5 s'assemblent en oligomères filamenteux le long de l'ARNdb²⁷⁻²⁹. De

la même façon que pour RIG-I, des chaînes de poly-ubiquine K63 se lient au tandem des domaines CARDS de MDA5 pour induire la signalisation en aval⁵ (**Figure 1**).

3.1.2 MAVS, une protéine adaptatrice pour la transmission du signal

La signalisation en aval de RIG-I dépend grandement de la protéine adaptatrice de signalisation mitochondriale antivirale (MAVS aussi appelée IPS-1, CARDIF et VISA)³⁰⁻³³. MAVS, muni d'un domaine CARD à son extrémité N-terminale est capable d'interagir avec RIG-I et MDA5 afin d'induire la signalisation. De plus, de par un domaine transmembranaire à son extrémité C-terminale, MAVS est localisé à la membrane externe de la mitochondrie^{25,26,34}. Ainsi, suite à une infection virale, l'interaction des domaines CARDS de RIG-I et MAVS induit une agrégation massive des protéines MAVS à la mitochondrie³⁵. Cette agrégation induit une amplification rapide et robuste de la signalisation RIG-I, cohérente avec le fait que de très faibles niveaux d'ARN sont capables de déclencher une activation IRF3 et IRF7 puissante dans les cellules²⁶. Les RLRs et MAVS induisent les IFNs de type I et les cytokines pro-inflammatoires via deux kinases cytosoliques, IKK et TBK1. Certaines E3 ligases telles que TRAF3, TRAF5, cIAP1/2 et MIB1/2 semblent réguler l'activation de NF- κ B et IRF3/IRF7 en aval de MAVS en recrutant la protéine NEMO³⁶⁻⁴⁰. En effet, NEMO, la sous unité régulatrice de IKK et TBK1 détecte l'ubiquitine accumulée au complexe MAVS/RIG-I ou MDA5 lors d'infection virale et permet l'activation de IKK et TBK1 en aval⁴¹⁻⁴⁴. Ensuite, IRF3, IRF7 et NF- κ B avec la protéine Act-1 induisent l'activation transcriptionnelle d'IFNs et autres cytokines (p. ex., TNF, IL-6, IL-8) et de nombreux gènes stimulés par les IFNs (ISGs) pour créer un milieu antiviral dans les cellules infectées et non infectées environnantes (**Figure 1**).

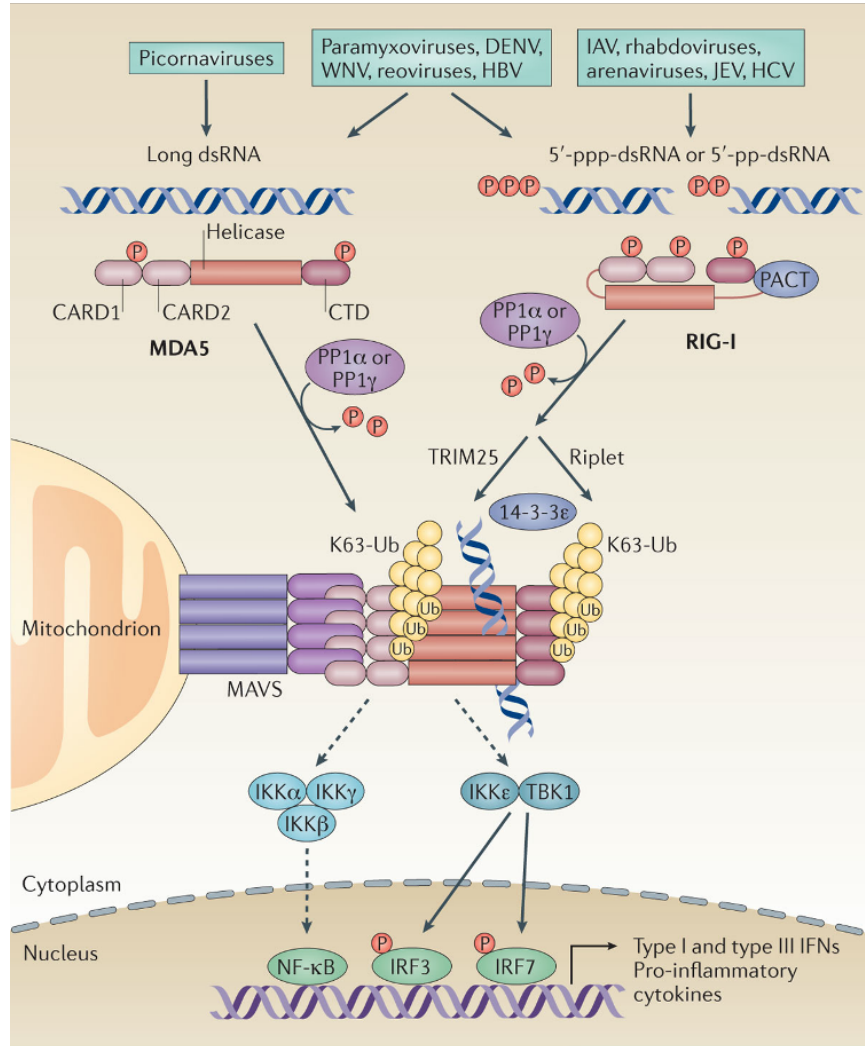


Figure 1. – Les récepteurs de type RIG-I (RLR) ont été identifiés comme des capteurs d'ARN viraux cytoplasmiques importants qui reconnaissent l'ARN génomique et / ou les intermédiaires de réplication de l'ARN de nombreux virus. Les deux membres des RLRs, la protéine du gène I inductible par l'acide rétinoïque (RIG-I) et la protéine 5 associée à la différenciation des mélanomes (MDA5) sont maintenues inactives dans les cellules non infectées par la phosphorylation de leurs domaines d'activation et de recrutement des caspases (CARD) et carboxy-terminaux domaines (CTD). De plus, RIG-I adopte une conformation auto-inhibée «fermée». Après une infection virale, RIG-I reconnaît l'ARN viral court à double brin cytoplasmique (ARNdb) qui contient un groupement 5'-triphosphate ou 5'-diphosphate, tandis que MDA5 détecte les longues structures d'ARNdb. Après la liaison de l'ARN, RIG-I et MDA5 sont déphosphorylés par PP1α ou PP1γ, ce qui induit la formation d'une conformation CARD active pour la signalisation. RIG-I est en outre activé par l'ubiquitylation liée à Lys63 de ses CARDS qui est médiée par la protéine de motif tripartite 25 (TRIM25). Riplet, une

autre d'ubiquitine ligase E3, assure la médiation de l'ubiquitylation liée au Lys63 du CTD de RIG-I, qui est également cruciale pour l'activation de RIG-I. L'ubiquitylation liée à Lys63 induit la tétramérisation de RIG-I (la forme active de signalisation de RIG-I), qui interagit ensuite avec la protéine de signalisation antivirale mitochondriale adaptatrice (MAVS) sur les mitochondries, les membranes associées aux mitochondries (MAMs). Dans le cas de MDA5, la liaison à un long dsRNA induit la formation de filaments de MDA5, ce qui permet ensuite à MDA5 de se lier à MAVS. MAVS active TBK1 ou I κ B kinase- ϵ (IKK ϵ) ainsi que le complexe IKK α – IKK β – IKK γ , qui activent le facteur de régulation 3 (IRF3) et IRF7 de l'interféron (IFN) et le facteur nucléaire κ B (NF- κ B), respectivement, par des événements de phosphorylation. IRF3 et / ou IRF7 et NF- κ B conjointement avec la protéine activatrice 1 (AP1; non illustré) induisent l'expression des gènes des IFN de type I (principalement les sous-types IFN α et IFN β), les IFN de type III (sous-types IFN λ) et de nombreux autres cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, pour établir un état antiviral. Les flèches pleines indiquent les événements de signalisation directe. Les flèches en pointillés indiquent les événements de signalisation indirecte. DENV, virus de la dengue; VHB, virus de l'hépatite B; VHC, virus de l'hépatite C; IAV, virus de la grippe A; JEV, virus de l'encéphalite japonaise; K63-Ub, ubiquitylation liée à Lys63; P, phosphate; PACT, activateur de la protéine kinase R; Ub, ubiquitine; VNO, virus du Nil occidental.

3.1.3 Les régulateurs des récepteurs de type RIG-I

La signalisation innée induite par les RLRs est hautement régulée pour contrôler efficacement les infections tout en minimisant les dommages auto-immuns.

Premièrement, cette régulation passe par des ubiquitines ligases et enzymes de déubiquitination (DUBs)⁴⁵⁽⁷⁷⁾. Ainsi, TRIM 25 et Riplet sont des régulateurs positifs de RIG-I en synthétisant des chaînes de polyubiquitine de type K63^{23,25,26}. Deux autres ubiquitines ligases, RNF125 et c-CBL sont des régulateurs négatifs de RIG-I en induisant cette fois-ci la poly-ubiquitination liée à K48 de RIG-I menant à sa dégradation par le protéasome^{46,47}. RNF125 est aussi capable d'induire l'ubiquitination de MDA5 et MAVS⁴⁶. Les enzymes de déubiquitination telles que CYLD et USP4 sont aussi impliquées dans la régulation de RIG-I. Alors que CYLD est capable d'interagir avec RIG-I et éliminer ses

chaînes de polyubiquitine de type K63 pour atténuer la réponse antivirale^{48,49}, USP4 est un régulateur positif qui déubiquitine les chaînes de type K48 et stabilise la protéine⁴⁹.

Finalement, un grand nombre d'autres modifications postraductionnelles sont impliquées dans la régulation des RLRs. Par exemple, la kinase d'adhésion focale FAK facilite l'activation de MAVS en transmettant un signal entre la matrice extracellulaire et le cytoplasme⁵⁰, alors que ZAPS, l'isoforme court de la polymérase poly(ADP-ribose) 13 s'associe à RIG-I pour favoriser son oligomérisation et son activité ATPase⁵¹.

Des dérèglements dans la signalisation RLR peuvent engendrer plusieurs maladies auto-immunes. Des formes de Lupus sont à l'origine de présence aberrante d'ARN 5'-triphosphate. De plus, des niveaux élevés de RIG-I ont été détectés chez les patients atteints de psoriasis et arthrite rhumatoïde. Par ailleurs, la perte de fonction de RIG-I ou MDA5 est associée à une résistance au diabète de type II.

3.2 La reconnaissance des ADNs cytoplasmiques

L'ADN muni d'îlots CpG peut induire une réponse IFN de type I via le TLR9 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Cependant, beaucoup de cellules qui n'expriment pas les TLR9 sont capables de produire de manière robuste les IFNs de type I suite à la délivrance d'ADN exogène dans le cytoplasme^{52,53}. Cette signalisation cytosolique indépendante des TLR9 fonctionne dans une variété de types cellulaires tels que les fibroblastes, les pDCs, les cellules dendritiques conventionnelles et les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDMs)⁵².

3.2.1 La détection directe et indirecte d'ADN

Premièrement, il a été démontré que l'ADNdb (p. ex., poly(dA :dT) était capable d'activer les IFNs de type I et NF- κ B de manière dépendante de MAVS⁵³. En effet, la polymérase III (Pol-III) dépendante de séquences riches en AT permet la conversion de poly(dA :dT) en ARN muni de 5'-triphosphate et de structures secondaires double brin^{54,55}. Cette forme d'ARN peut servir de ligand pour RIG-I et déclencher une production d'IFN de type I par MAVS. La dépendance stricte de la Pol-III pour les séquences riches en AT suggère cependant d'autres voies de détection de l'ADN.

Ainsi, la synthase de GMP-AMP cyclique (cGAS), de la famille des nucléotidyltransférases (NTases) est le récepteur principal de l'ADN cytosolique^{56,57}. Suite à son activation, cGAS catalyse la production du dinucléotide GMP-AMP cyclique (cGAMP). cGAMP sert ensuite de deuxième messager endogène et active la protéine adaptatrice stimulatrice des gènes IFN (STING)⁵⁷. Celle-ci induit l'activation de IRF3 et NF- κ B pour permettre une production d'IFN- β ^{58,59}. Certains autres récepteurs sont capables de détecter l'ADN. Parmi ceux-ci, on compte l'activateur des IRFs dépendant de l'ADN^{74,75}, IFI16/p204⁷⁶, le membre de la famille des hélicases DExD/H, DDX41⁷⁷, la protéine kinase dépendante des ADNs (DNA-PK) et MRE11⁷⁸⁻⁸⁰ (**Figure 2**).

Finalement, la présence d'ADN dans le cytoplasme de macrophages déclenche aussi la voie de l'inflammasome, un complexe intracellulaire multi protéique qui induit

l'activation de l'enzyme protéolytique caspase-1 et la maturation d'IL-1 β ⁶⁰. Le récepteur pour l'ADN cytoplasmique responsable de la voie de l'inflammasome est AIM2⁶¹⁻⁶⁴.

3.2.2 STING, une protéine adaptatrice pour la transmission du signal induit par cGAS

STING (aussi appelé MITA, MPYS, ERIS et TMEM173) est une protéine adaptatrice cruciale pour l'induction d'IFNs de type I⁶⁵⁻⁶⁷. Elle est localisée au réticulum endoplasmique et contient cinq domaines transmembranaires et un long domaine cytoplasmique⁶⁵. Suite à la liaison de cGAMP à STING, une dimérisation d'ensuit permettant à TRIM32 et TRIM56 de remplir leur fonction et induire ainsi une poly-ubiquitination K63 de STING. Une relocalisation de STING à l'appareil de golgi^{68,69} permet ensuite une interaction avec TBK1, sa phosphorylation et l'activation d'IRF3⁷⁰ (**Figure 2**).

Par ailleurs, STING peut aussi directement lier et détecter les dinucléotides cycliques (CDNs). Ces acides dinucléiques sont des messagers secondaires bactériens ayant un rôle de régulation dans plusieurs processus tels que la formation de biofilm, la virulence, et la surveillance de l'intégrité de l'ADN^{71,72}. Ils comprennent le (3'-5') diguanylate (c-di-GMP) cyclique et le (3'-5') diadenylate (c-di-AMP). La présence de CDNs dans le cytoplasme de cellules mammifères mène à l'activation de TBK1 et IRF3 et la production d'IFNs de type I^{12,73}.

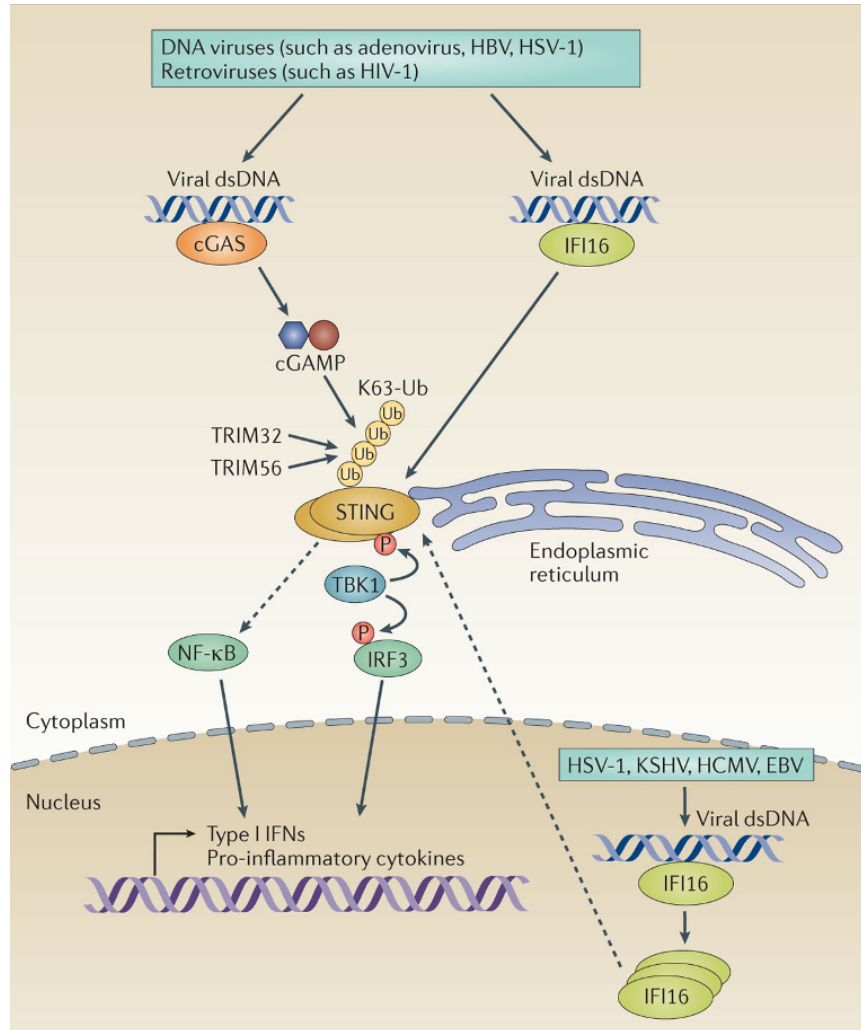


Figure 2. – Dans le cytoplasme des cellules infectées, la GMP – AMP synthase cyclique (cGAS) reconnaît l'ADN double brin (ADNdb) des virus à ADN ou l'ADNdb produit par les rétrovirus grâce à la transcription inverse de leurs génomes à ARN. Après la liaison de l'ADN, le cGAS synthétise le second messager GMP-AMP cyclique (cGAMP), qui se lie ensuite et active le stimulateur des gènes de l'interféron (IFN) (STING) sur le réticulum endoplasmique. STING est en outre activé par dimérisation et ubiquitylation liée à Lys63 qui est médiée par la protéine de motif tripartite 32 (TRIM32) et TRIM56. De plus, STING est phosphorylé par TBK1. La protéine inductible par l'IFN γ capteur 16 (IFI16) détecte l'ADNdb viral à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Après la liaison de l'ADN viral, IFI16 multimérisise puis signale par STING dans le cytoplasme. L'activation de STING induit l'expression de gènes IFN de type I et d'autres cytokines pro-inflammatoires via l'axe TBK1 – IFN du facteur régulateur 3 (IRF3) et le facteur nucléaire κ B (NF- κ B). Des flèches pleines indiquent des événements de signalisation bien établis. Les flèches en pointillés indiquent les événements de signalisation qui sont indirects ou

qui n'ont pas encore été entièrement élucidés. EBV, virus Epstein – Barr; VHB, virus de l'hépatite B; HCMV, cytomégalovirus humain; HSV-1, virus de l'herpès simplex 1; K63-Ub, ubiquitylation liée à Lys63; KSHV, virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi; P, phosphate; Ub, ubiquitine.

3.2.3 La reconnaissance des ADNs et l'auto-immunité

Bien que la détection d'ADN étranger dans le cytoplasme permette à l'hôte de détecter de manière efficace une grande variété de pathogènes, cette stratégie repose sur le potentiel de reconnaissance de l'ADN de l'hôte, ce qui peut mener à de l'auto-immunité. Trois mécanismes majeurs ont été développés par l'hôte pour éviter la détection inappropriée d'ADN endogène. Premièrement, le récepteur de l'hôte reconnaît préférentiellement des structures ou modifications seulement présentes dans le génome du pathogène. Deuxièmement, la distribution du récepteur est restreinte à certains compartiments cellulaires démunis d'ADN de l'hôte. Troisièmement, le déploiement de certaines nucléases endogènes garde les niveaux d'ADN de l'hôte sous un seuil d'activation des récepteurs.

La digestion incomplète d'ADN peut induire une réponse inflammatoire aberrante observée chez les patients avec mutations au niveau de la DNase I atteints de SLE. De plus elle peut induire des manifestations de Lupus chez les souris déficientes en DNase I et de l'anémie ou arthrite chez les souris déficientes en DNase II.

3.3 Conclusion

La dernière décennie a été témoin d'énormes progrès dans la compréhension de la reconnaissance innée d'acides nucléiques dérivés de pathogènes et leur rôle central dans l'initiation de la réponse défensive de l'hôte. Des études dans le domaine des récepteurs aux acides nucléiques cytoplasmiques ont été très fructueuses, et comprennent la découverte de la voie RLR-MAVS pour la détection des ARNs cytoplasmiques et de la voie cGAS-cGAMP-STING pour la reconnaissance des ADNs

cytoplasmiques. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour découvrir de nouveaux composants et mécanismes de régulation de ces signalisations.

3.4 Références

1. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*. 2013;38(5):855-869.
2. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*. 2004;5(7):730-737.
3. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*. 2005;175(5):2851-2858.
4. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, et al. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004;101(49):17264-17269.
5. Jiang X, Kinch LN, Brautigam CA, et al. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity*. 2012;36(6):959-973.
6. Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol*. 2010;20(1):4-22.
7. Venkataraman T, Valdes M, Elsbey R, et al. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol*. 2007;178(10):6444-6455.
8. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, et al. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(4):1512-1517.
9. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 2006;314(5801):994-997.
10. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006;314(5801):997-1001.

11. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 2008;205(7):1601-1610.
12. Woodward JJ, Iavarone AT, Portnoy DA. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science*. 2010;328(5986):1703-1705.
13. Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006;441(7089):101-105.
14. Loo YM, Fornek J, Crochet N, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol*. 2008;82(1):335-345.
15. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006;103(22):8459-8464.
16. Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M, Jr. Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *J Virol*. 2008;82(2):609-616.
17. Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, et al. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell*. 2011;147(2):423-435.
18. Kolakofsky D, Kowalinski E, Cusack S. A structure-based model of RIG-I activation. *Rna*. 2012;18(12):2118-2127.
19. Leung DW, Amarasinghe GK. Structural insights into RNA recognition and activation of RIG-I-like receptors. *Curr Opin Struct Biol*. 2012;22(3):297-303.
20. Jiang F, Ramanathan A, Miller MT, et al. Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature*. 2011;479(7373):423-427.
21. Civril F, Bennett M, Moldt M, et al. The RIG-I ATPase domain structure reveals insights into ATP-dependent antiviral signalling. *EMBO Rep*. 2011;12(11):1127-1134.

22. Godbole AA, Ahmed W, Bhat RS, Bradley EK, Ekins S, Nagaraja V. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis topoisomerase I by m-AMSA, a eukaryotic type II topoisomerase poison. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(4):916-920.
23. Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem.* 2009;284(2):807-817.
24. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe.* 2010;8(6):496-509.
25. Gack MU, Shin YC, Joo CH, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature.* 2007;446(7138):916-920.
26. Zeng W, Sun L, Jiang X, et al. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell.* 2010;141(2):315-330.
27. Peisley A, Lin C, Wu B, et al. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2011;108(52):21010-21015.
28. Berke IC, Modis Y. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA. *Embo j.* 2012;31(7):1714-1726.
29. Wu B, Peisley A, Richards C, et al. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell.* 2013;152(1-2):276-289.
30. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell.* 2005;122(5):669-682.
31. Kawai T, Takahashi K, Sato S, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol.* 2005;6(10):981-988.
32. Meylan E, Curran J, Hofmann K, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature.* 2005;437(7062):1167-1172.

33. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*. 2005;19(6):727-740.
34. Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M, Jr. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2011;108(35):14590-14595.
35. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 2011;146(3):448-461.
36. Paz S, Vilasco M, Werden SJ, et al. A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response. *Cell Res*. 2011;21(6):895-910.
37. Saha SK, Pietras EM, He JQ, et al. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *Embo j*. 2006;25(14):3257-3263.
38. Tang ED, Wang CY. TRAF5 is a downstream target of MAVS in antiviral innate immune signaling. *PLoS One*. 2010;5(2):e9172.
39. Li S, Wang L, Berman M, Kong YY, Dorf ME. Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. *Immunity*. 2011;35(3):426-440.
40. Mao AP, Li S, Zhong B, et al. Virus-triggered ubiquitination of TRAF3/6 by cIAP1/2 is essential for induction of interferon-beta (IFN-beta) and cellular antiviral response. *J Biol Chem*. 2010;285(13):9470-9476.
41. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell*. 2006;22(2):245-257.
42. Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol*. 2006;8(4):398-406.

43. Zeng W, Xu M, Liu S, Sun L, Chen ZJ. Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Mol Cell*. 2009;36(2):315-325.
44. Liu S, Chen J, Cai X, et al. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife*. 2013;2:e00785.
45. Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J Biochem*. 2012;151(1):5-11.
46. Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007;104(18):7500-7505.
47. Chen W, Han C, Xie B, et al. Induction of Siglec-G by RNA viruses inhibits the innate immune response by promoting RIG-I degradation. *Cell*. 2013;152(3):467-478.
48. Friedman CS, O'Donnell MA, Legarda-Addison D, et al. The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep*. 2008;9(9):930-936.
49. Wang L, Zhao W, Zhang M, et al. USP4 positively regulates RIG-I-mediated antiviral response through deubiquitination and stabilization of RIG-I. *J Virol*. 2013;87(8):4507-4515.
50. Bozym RA, Delorme-Axford E, Harris K, et al. Focal adhesion kinase is a component of antiviral RIG-I-like receptor signaling. *Cell Host Microbe*. 2012;11(2):153-166.
51. Hayakawa S, Shiratori S, Yamato H, et al. ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nat Immunol*. 2011;12(1):37-44.
52. Stetson DB, Medzhitov R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity*. 2006;24(1):93-103.
53. Ishii KJ, Coban C, Kato H, et al. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol*. 2006;7(1):40-48.
54. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*. 2009;138(3):576-591.

55. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol.* 2009;10(10):1065-1072.
56. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science.* 2013;339(6121):786-791.
57. Wu J, Sun L, Chen X, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science.* 2013;339(6121):826-830.
58. Gao D, Wu J, Wu YT, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science.* 2013;341(6148):903-906.
59. Li XD, Wu J, Gao D, Wang H, Sun L, Chen ZJ. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science.* 2013;341(6152):1390-1394.
60. Muruve DA, Pétrilli V, Zaiss AK, et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature.* 2008;452(7183):103-107.
61. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature.* 2009;458(7237):509-513.
62. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* 2009;458(7237):514-518.
63. Bürckstümmer T, Baumann C, Blüml S, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol.* 2009;10(3):266-272.
64. Roberts TL, Idris A, Dunn JA, et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science.* 2009;323(5917):1057-1060.
65. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature.* 2008;455(7213):674-678.

66. Zhong B, Yang Y, Li S, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*. 2008;29(4):538-550.
67. Sun W, Li Y, Chen L, et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2009;106(21):8653-8658.
68. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*. 2009;461(7265):788-792.
69. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2009;106(49):20842-20846.
70. Tanaka Y, Chen ZJ. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal*. 2012;5(214):ra20.
71. Tamayo R, Pratt JT, Camilli A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:131-148.
72. Römling U. Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea. *Sci Signal*. 2008;1(33):pe39.
73. McWhirter SM, Barbalat R, Monroe KM, et al. A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *J Exp Med*. 2009;206(9):1899-1911.
74. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun*. 2015;60:1-11.
75. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*. 2007;448(7152):501-505.
76. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol*. 2010;11(11):997-1004.
77. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu YJ. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011;12(10):959-965.
78. Ferguson BJ, Mansur DS, Peters NE, Ren H, Smith GL. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife*. 2012;1:e00047.

79. Zhang X, Brann TW, Zhou M, et al. Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. *J Immunol.* 2011;186(8):4541-4545.
80. Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, et al. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2013;110(8):2969-2974.

Chapitre 4

4 Interleukin-17 Receptor D is a negative regulator of nucleic acid sensor signaling

Charlotte Girondel^{1,2}, Kim Lévesque¹, Florence Dô¹, Marc Servant⁴, and Sylvain Meloche^{1,2,5}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, Quebec, Canada.

²Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

³Center for Molecular Medicine, Maine Medical Center Research Institute, Scarborough, Maine, USA.

⁴Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

⁵Molecular Biology Program, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence and requests for materials should be addressed to:

Dr Sylvain Meloche (email: sylvain.meloche@umontreal.ca)

4.1 Mise en contexte

IL-17RD a été démontré comme régulant négativement la production de cytokines pro-inflammatoires en inhibant les voies de signalisation NF- κ B et IRF dépendantes des TLRs. Alors que certaines études démontrent un rôle via son interaction avec les protéines adaptatrices Myd88 et MAL, d'autres ont rapporté une interaction avec la sous unité p50 de NF- κ B. IL-17RD semble ainsi détenir un large potentiel quant à la régulation de voies de l'inflammation. La régulation des voies de signalisation TLRs est critique afin de prévenir les pathologies induites par l'immunité, éviter la persistance de l'inflammation et retourner à un état d'homéostasie suite à l'infection. Une régulation négative est aussi essentielle dans la réponse antivirale.

Par conséquent, nous avons décidé d'évaluer si le potentiel régulateur d'IL-17RD s'étendait à la réponse immunitaire innée antivirale induite par les récepteurs cytoplasmiques. Cet article représente une piste robuste intéressante sur un nouveau rôle inhibiteur d'IL-17RD dans la réponse immunitaire innée antivirale induite par RIG-I.

4.2 Contribution des auteurs

Charlotte Girondel a conceptualisé le projet, mis en place et exécuté les expériences, analysé les résultats et écrit cette première version du manuscrit.

Kim Lévesque a aidé à la mise en place du modèle d'infection au VSV et aidera à l'exécution des expériences associées.

Florence Dô a contribué à la production de virus VSV-GFP pour l'expérience d'infection *in vivo*.

Marc Servant a conceptualisé le projet, analysé les résultats, contribué aux discussions générales sur le projet et approuvé cette première version du manuscrit.

Sylvain Meloche a conceptualisé le projet et analysé les résultats.

4.3 Abstract

Nucleic acid recognition which induces antiviral and/or antimicrobial host responses relies mainly on two different receptor families, namely TLRs and RLRs. While TLRs allow nucleic acids detection inside endosomes and lysosomes of immune cells, RLRs are responsible for recognition of nucleic acid that have successfully invaded the host cytoplasm of non-immune cells, which do not express TLRs. Interleukin-17 receptor D (IL-17RD), also known as Similar expression to FGF genes (SEF) was shown to negatively regulate pro-inflammatory cytokine and TLR3/4-dependent NF- κ B as well as IRF3 signaling pathways through SEFIR/TIR interactions. IL-17RD was also shown to regulate RNA based encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in MEFs. However, the role of IL-17RD in antiviral innate immunity mediated by nucleic acid sensors remains to be studied. Here, we show that IL-17RD deficiency leads to increased interferon and pro-inflammatory cytokine transcription upon poly(I:C) treatment and Sendai Virus (SeV) infection in different epithelial cell types. Moreover, IL-17RD expression specifically inhibits RIG-I signaling, potentially via a preferential interaction with the ubiquitinated form of RIG-I. Our findings establish IL-17RD as a new regulator of antiviral innate immune response mediated by RIG-I.

4.4 Introduction

The innate immune system is the first line of defense when it comes to detecting pathogens and triggering an inflammatory response within minutes after an infection. In order to do so, it has acquired a plethora of pattern-recognition receptors (PRRs) to detect infections by recognizing conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) absent on host cells¹. While the best characterized PRRs, the toll-like receptors (TLRs) are present at the plasma and endosomal membranes to detect extracellular PAMPs²⁻¹¹, other cytoplasmic receptors such as nucleotide oligomerization domain receptors (NLRs)^{12,13} and retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) like receptors (RLRs) complete PAMPs recognition by respectively sensing bacterial or viral nucleic acids once they enter the cell. More specifically, RIG-I and MDA5 are cytoplasmic dsRNA sensors whose activation results in the induction of NF- κ B and interferon regulatory factors (IRFs) signaling pathways¹⁴. Upon recognition of pathogenic RNAs, RIG-I translocates into the mitochondria and interacts with the adaptor protein MAVS (IPS-1)¹⁵. Activated MAVS recruits signaling proteins such as TRAF6, TRAF3, TBK1 and the IKK complex leading to the activation of downstream innate signaling^{16,17}. Like other signaling pathways, the RIG-I-mediated antiviral pathway is modulated by various post-translational modifications such as ubiquitination^{18,19}. Indeed, RIG-I ubiquitination by E3 ligases TRIM25 and Riplet are necessary for its subsequent interaction with MAVS and downstream signaling^{20,21}.

IL-17RD, also known as Similar expression to FGF genes (SEF), is a member of the IL-17 receptor family²². It was first identified in zebrafish as a feedback inhibitor of fibroblast growth factor (FGF)-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling^{23,24}. Subsequent studies with the mammalian form of IL-17RD have described a regulatory role in ERK1/2 and JNK signaling pathways by protein-protein interactions²⁵⁻²⁸. On the other hand, conflicting studies reported a regulatory role of IL-17RD in modulating IL-17A signaling²⁹⁻³¹.

More interestingly, IL-17RD was also shown to negatively regulate pro-inflammatory cytokine and IL1R/TLR-dependent NF- κ B as well as IRF3 signaling pathways via a SEFIR/TIR interaction, resulting in attenuation of inflammatory gene expression³². To

support their hypothesis, Mellet and colleagues reported that loss of IL-17RD increases the immune response triggered by the RNA based encephalomyocarditis virus (EMCV) in mouse embryonic fibroblasts (MEFs)³². However, TLR3 is expressed at very low levels and does not play a major role for RNA recognition and signaling transduction in this cell line³³. These observations led us to the hypothesis that IL-17RD could be a potential regulator of viral RNA signaling mediated by cytoplasmic sensors, namely RIG-I or MDA5.

In this study, we show that IL-17RD deficiency increases pro-inflammatory cytokine and IRF3 transcription upon poly(I:C) treatment and Sendai Virus (SeV) infection in different epithelial cell types. Moreover, IL-17RD expression specifically inhibits RIG-I signaling, potentially via a preferential interaction with the ubiquitinated form of RIG-I. Our findings establish IL-17RD as a new regulator of antiviral innate immune response mediated by RIG-I.

4.5 Results

4.5.1 Loss of Il17rd promotes poly(I:C) induced innate immune response

To directly address IL-17RD function in RNA/DNA sensors-mediated signaling, interferon and cytokine transcription was measured in MC-38 murine colon adenocarcinoma cells, depleted of IL-17RD by siRNAs. The RIG-I/MDA5/TLR3 agonist poly(I:C) and the DNA/RNA sensor agonist poly(dA:dT) were used to trigger an innate immune response. Firstly, in order to bypass a potential TLR response, poly(I:C) or poly(dA:dT) were transfected directly into MC-38 cells. A 50-60% loss of IL-17RD significantly increased interferon- β (*Ifnb1*) and *Rantes* transcription upon poly(I:C) transfection (Fig. 1A). Moreover, loss of IL-17RD slightly increased *Ifnb1* and *Rantes* transcription upon indirect RNA and DNA sensors stimulation by poly(dA:dT) transfection, although it did not reach significance (Fig. 1A). Secondly, poly(I:C) was directly added to the media in order to potentially induce TLR3 dsRNA recognition. Loss of IL-17RD upon poly(I:C) stimulation showed that, (i) the response to TLR3 is very weak in MC-38 cells overall and (ii) a moderate but not significant increase of *Ifnb1* transcription was observed without any change on *Rantes* transcription, suggesting that the increased response observed previously upon transfection of poly(I:C) is indeed due to the RLR signaling pathways and not TLR3 (Fig. 1B). These last results were not surprising since non metastatic intestinal epithelial cells (IECs) do not normally express TLR3³⁴. Consistent with those observations, Loss of IL-17RD in another physiological model, the human alveolar basal epithelial cell line A549 upon poly(dA:dT) or RNA based SeV infection (n=1) showed similar results, i.e. increased *Ifnb1* and *Rantes* cytokine transcriptional expression (Fig. S1). These results suggest that IL-17RD may play a critical role in RIG-I/MDA5 mediated interferon and cytokine production.

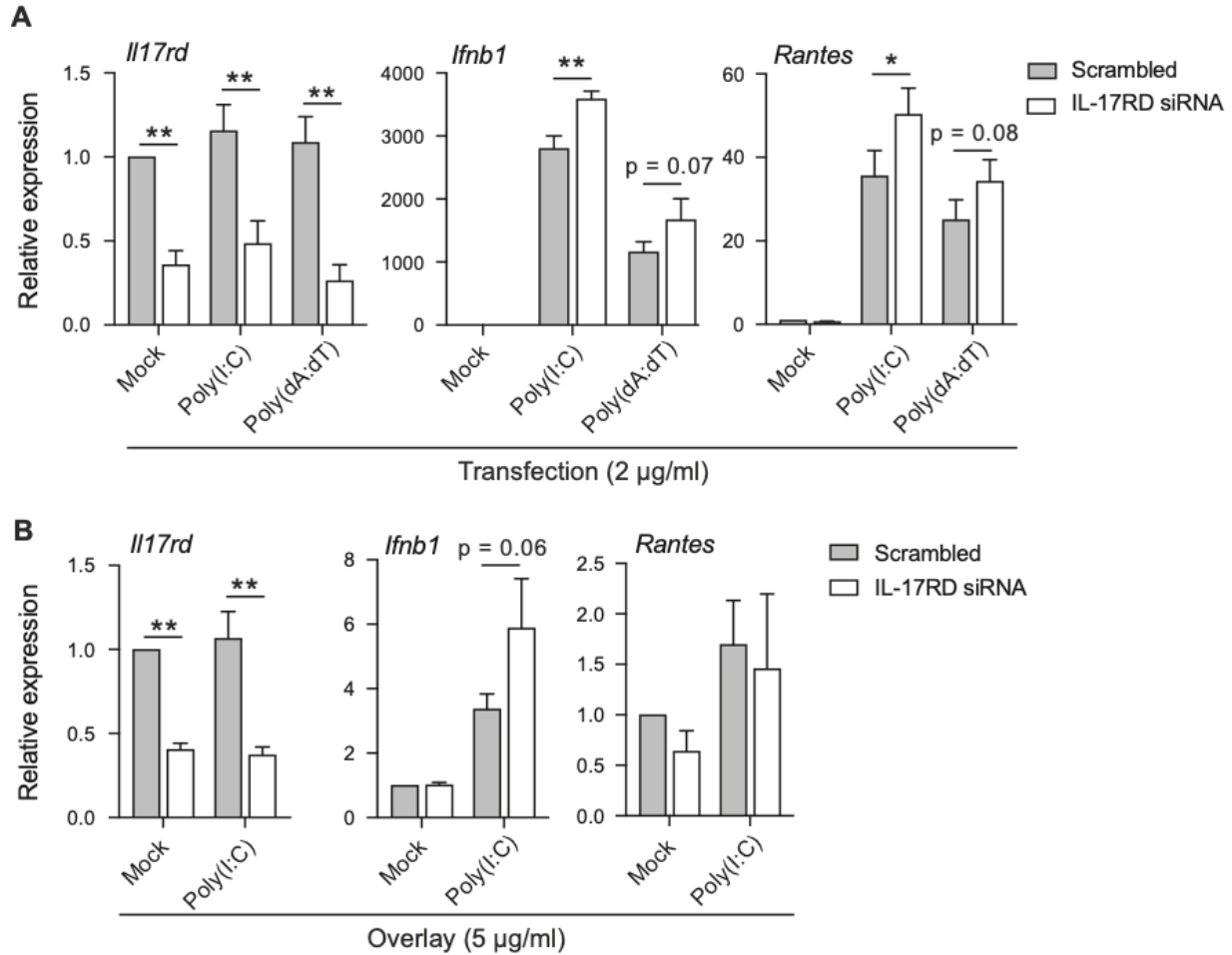


Figure 1. – IL-17RD suppresses RIG-I mediated immune response in MC-38 cells. (A) MC-38 cells were transfected with control or Il17rd pooled siRNAs for 48 hours and then with poly(I:C) or poly(dA:dT) for 3 hours. Relative mRNA expression levels of NF-κB and IRF targets were monitored by qPCR. Data are expressed as mean ± SD (n = 3). **p < 0.01, *p < 0.05. (B) MC-38 cells were transfected with control or Il17rd pooled siRNAs for 48 hours and then overlaid with poly(I:C) for 3 hours. Relative mRNA expression levels of NF-κB and IRF targets were monitored by qPCR. Data are expressed as mean ± SD (n = 3). **p < 0.01.

4.5.2 IL-17RD negatively regulates RIG-I and TRIF signaling pathways but not cGAS-STING

To dissect whether IL-17RD can directly regulate RIG-I and/or other cytosolic nucleic acid immune signaling pathways such as the DNA sensor cGAS/STING signaling, we assessed interferon stimulated responsive element (ISRE) and NF- κ B luciferase activities in response to different activators in absence or presence of IL-17RD. Since it was shown in prior work that IL-17RD regulated TLR signaling by inhibiting TRIF, TRAM, MAL and Myd88 mediated NF- κ B activity³², we used one of those adaptor proteins (i.e. TRIF) as a positive control for our experiments. Consistent with those previous studies, TRIF mediated ISRE and NF- κ B activities were almost completely abrogated upon IL-17RD expression even at low concentrations such as 30 ng (Fig. 2A). Next, we assessed RIG-I or cGAS/STING regulation by IL-17RD. First, we observed a dose dependent inhibition of RIG-I mediated ISRE and NF- κ B activities reaching from 46% to more than 68% inhibition respectively with 100ng of IL-17RD. Second, cGAS/STING mediated activities were not affected with 30ng of IL-17RD and not more than 28% inhibition was observed with 100ng (Fig. 2A). Those results suggest a specific inhibitory role of IL-17RD on the RIG-I signaling pathway. Moreover, to further confirm the impact of IL-17RD expression on those signaling pathways, ISRE activity was assessed upon increased TRIF, RIG-I and cGAS/STING signaling induction in the presence of 100ng of IL-17RD. Interestingly, IL-17RD was able to inhibit TRIF and RIG-I induced signaling. However, cGAS/STING mediated ISRE activity was not affected, reinforcing our hypothesis that RNA sensor mediated signaling is affected by IL-17RD but not DNA sensor mediated signaling. Among RNA sensors, the cytosolic RIG-I mediated signaling is specifically regulated by IL-17RD (Fig. 2B).

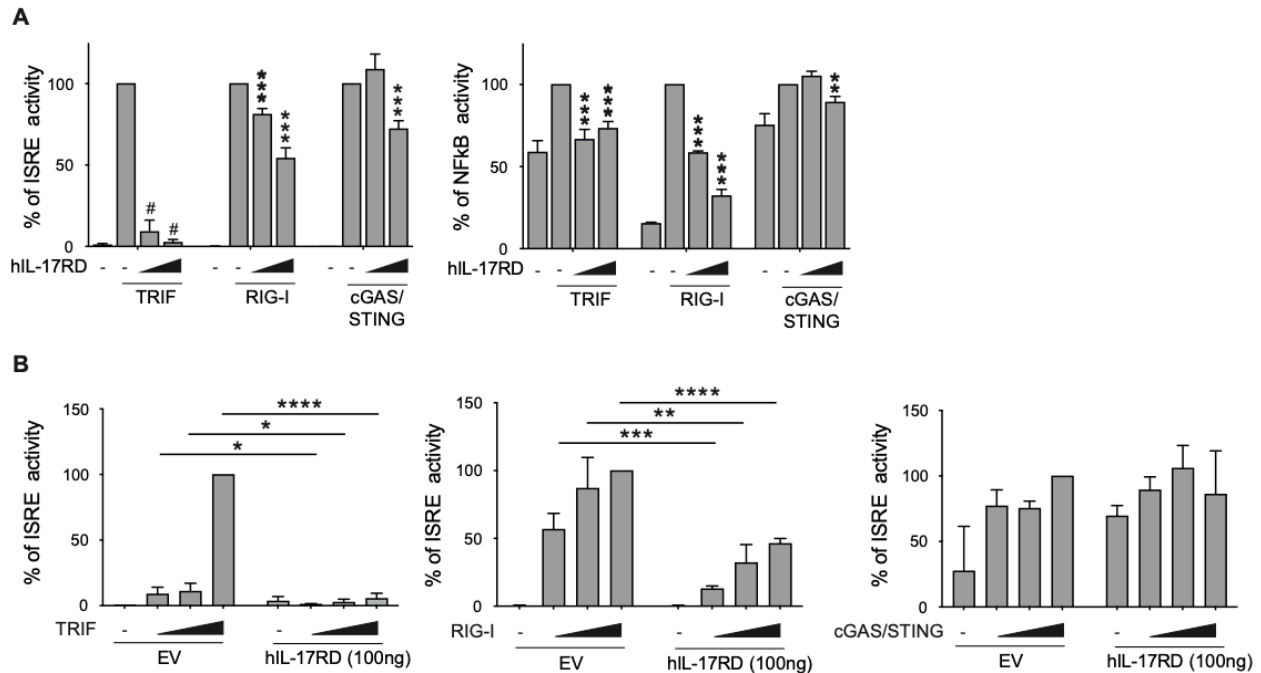


Figure 2. – IL-17RD inhibits RIG-I mediated ISRE and NF-kB luciferase activities. (A) HEK293T cells were transfected with 100ng of the indicated plasmids or empty vector (EV) and hIL-17RD at increasing concentrations (30ng and 100ng) for 24 hours. ISRE and NF-kB luciferase activities were measured. Data are means \pm SD (n = 3). **p < 0.01, ***p < 0.001, #p < 0.0001. (B) HEK293T cells were transfected with 100ng of hIL-17RD or empty vector (EV) and with the indicated plasmids at increasing concentrations (10ng, 30ng and 100ng) for 24 hours. ISRE luciferase activity was measured. Data are means \pm SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

4.5.3 IL17RD interacts with a potentially ubiquitinated form of RIG-I

Next, we examined whether IL-17RD physically interacts with RIG-I. HEK293T cells were transfected with vector or wild type Myc-IL-17RD construct in the presence or absence of poly(I:C). First, immunoprecipitation (IP) of Myc revealed a physical interaction between IL-17RD and RIG-I at a steady state (Fig. 3). Moreover, the molecular weight observed for RIG-I was higher than expected (>135kDa) suggesting a preferential interaction with its potentially ubiquitinated form. Indeed, the RIG-I sensor is activated through a K63-polyubiquitination on the CARD domain or by providing a K-63-linked unanchored polyubiquitin chain to RIG-I. Second, poly(I:C) stimulation did not seem to affect the level of interaction. However, interestingly, it seems that treatment with poly(I:C) induces a down-regulation of IL-17RD expression levels as seen on the input and after IP (Figure 3). This suggest that activation of innate immune signaling pathways in HEK293T represses IL-17RD expression, thereby establishing a potential positive feedback loop. All together, these results suggest that IL-17RD engages in an interaction with the ubiquitinated form of RIG-I at steady state and post-stimulation.

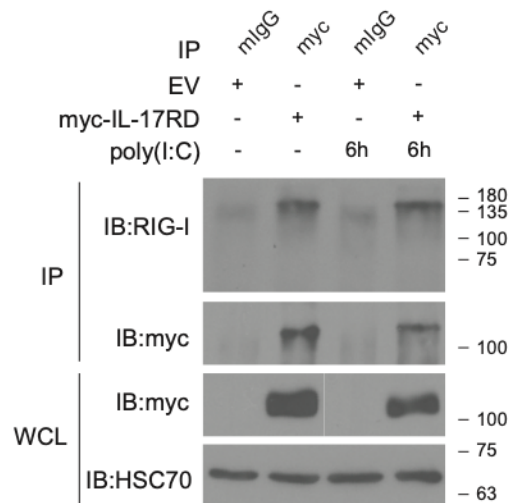


Figure 3. – IL-17RD interacts with a potentially ubiquitinated form of RIG-I. HEK293T cells were transfected with control or myc-IL-17RD constructs and either transfected or not with poly(I:C) for 6 hours. RIG-I/IL-17RD interaction was detected by immunoprecipitation using anti-myc antibody in HEK293T lysates and visualized by anti-

RIG-I and anti-myc antibodies. Abbreviations: IP, immunoprecipitation; WCL, whole cell lysates.

4.5.4 A physiological role for IL-17RD in mice: the VSV challenge mouse model

Finally, to assess the physiological role of IL-17RD on the antiviral immune response mediated by dsRNA *in vivo*, a vesicular stomatitis virus (VSV) challenge mouse model on WT and *Il17rd*^{-/-} mice was scheduled for mid-April 2020. The protocol has been accepted by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Université de Montréal under the Canadian Council on Animal Care (CCAC) accreditation. Unfortunately, due to the COVID-19 pandemic, the experiment was postponed until further notice. The aim of the experiment was to establish the susceptibility of *Il-17rd*^{-/-} mice to VSV induced lethality.

Briefly, to assess mice resistance to the virus, survival rate will be monitored over 36 hours post VSV infection (hpi). Moreover, to assess viral replication, viral load (VSV mRNA) will be measured in a variety of organs (i.e. liver, spleen and lungs) by RT-qPCR. Lastly, to assess the antiviral response, mRNA levels of *Irfn*, *Isg15* and *Irf1* will be measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by RT-qPCR. These results, when performed, will enable us to assess the physiological role of IL-17RD in innate antiviral defense in mice.

4.6 Discussion

The interest in the role of IL-17RD in the inflammatory response has grown over the last 10 years. A controversial role for IL-17RD was reported in the regulation of the IL-17 signaling pathway^{30,31,35}. However, a more consistent role for IL-17RD has been documented in the inhibition of IL1-R and TLR signaling resulting in the attenuation of inflammatory gene expression^{32,36,37}. The precise mechanism of inhibition of the IL1-R/TLR induced NF- κ B and IRF signaling pathways remains unclear, as different studies have proposed that IL-17RD acts at the level of the receptors and their adaptor proteins Myd88, MAL³², or NF- κ B itself^{36,37}. Moreover, some evidence from Mellett and colleagues has suggested a role in the sensor-mediated antiviral response³². Yet, the impact of IL-17RD deficiency on the antiviral innate immune response has not been fully addressed. Here, we show that IL-17RD suppresses the antiviral response in different types of intestinal epithelial cells by inhibiting the RIG-I RNA sensor signaling pathway.

Mellett and colleagues reported that loss of IL-17RD increases the immune response triggered by the RNA based encephalomyocarditis virus (EMCV) in mouse embryonic fibroblasts (MEFs)³². Therefore, we hypothesized that IL-17RD could be a potential regulator of viral RNA signaling mediated by cytoplasmic sensors, namely RIG-I and MDA5. RIG-I and MDA5 differentially induce type I IFN in response to different viral pathogens, with RIG-I generally responding most potently to small negative-stranded RNA viruses, while MDA5 is activated during infection with larger positive-strand viruses³⁸. Moreover, RIG-I and MDA5 can act both independently and synergistically as some viruses are recognized by both sensors. In the case of EMCV infection, it has been shown that the long dsRNA genome of this virus is recognized by MDA5 but not RIG-I³⁸. Firstly, consistent with the results observed in their study, loss of IL-17RD increased the antiviral response upon poly(I:C) transfection in MC-38 cells. Poly(I:C) being a very potent stimulator that can induce MDA5 and RIG-I signaling along with TLR3, those results reinforce previous observations but do not narrow down the specific signaling pathway regulated by IL-17RD. Then, we investigated the impact of IL-17RD specifically on RIG-I signaling and DNA sensor signaling, cGAS/STING. We were able to demonstrate the

specific regulatory role of IL-17RD on RIG-I sensor signaling among those two pathways. However, a specific implication of IL-17RD on the MDA5 signaling cannot be ruled out. Our results and Mellett and colleagues observations together strongly suggested a regulatory role for IL-17RD on RIG-I and MDA5. Consequently, we can hypothesize a regulation that would act downstream of the receptors as both RLRs signaling pathways seem to be regulated and both receptors activate the same adaptor protein MAVS to activate subsequent TBK1 and IRF3 pathways. Further experiments are needed to confirm this hypothesis and assess the role of IL-17RD in MDA5 signaling specifically.

Surprisingly, colP experiments show that IL-17RD interacts directly with RIG-I. Interestingly, IL-17RD is known to regulate signaling pathways at different levels. Indeed, IL-17RD inhibits the MAPK pathway at the level of the RTKs, Ras and/or MEK as well as TLR signaling at the level of Myd88 or MAL adaptor proteins and/or NF- κ B. Consequently, it could be hypothesized that RLR regulation by IL-17RD is not restricted to its interaction with RIG-I but potentially with other effector proteins downstream to regulate both RIG-I and MDA5 induced infections.

The RLR signaling pathway is tightly regulated to maximize antiviral immunity and minimize immune-mediated pathology. Indeed, positive regulation (i.e. Riplet, TRIM25) promotes an antiviral state to control and eventually clear infection^{20,21,39,40}, whereas negative regulation (i.e. LGP2, RNF125) dampens inflammation and prevents immune-mediated tissue damage^{8, 20, 30, 38, 41, 67}. Negative regulation of antiviral signaling is critical for reducing inflammation and returning to a homeostatic state following viral infection. Moreover, an overexuberant innate response can lead to cell tissue destruction, and the development of spontaneous autoimmunity including diseases such as Aicardi-Goutières syndrome (AGS), systemic lupus erythematosus, and Singleton-Merten syndrome⁴¹. Further study of specific negative regulators is required to determine whether they are capable to directly prevent such conditions.

Even though a lot more work remains to be done in order to unravel the exact mechanism by which IL-17RD regulates the RLR signaling pathway, our results lay the groundwork for an interesting new inhibitory function in the antiviral innate immune response.

4.7 Methods

4.7.1 Reagents and antibodies

Poly(dA:dT) (catalog # tlr-patn) and Poly(I:C) (catalog #27-4732-01) were purchased from InvivoGen and GE Healthcare respectively. Sendai virus (Sev) was the Cantell Strain from Charles River. Commercial antibodies were obtained from the following suppliers and used at the indicated concentrations. Antibodies for immunoblotting: RIG-I (1/1000; #3743) from Cell signaling Technology, c-myc (1/1000; sc-40) from Santa Cruz, and HSC70 (1/2000; sc-7298) from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies for immunoprecipitation: mlgG (2ug, #02-6502) from Life Technologies, c-myc (2ug, sc-40) from Santa Cruz. Plasmids encoding for RIG-I, TRIF, cGAS, STING and the pGL4-IRES-Luc, pGL4-NF-kB-Luc, pRL-TK reporting vectors were obtained from Marc Servant's laboratory. The plasmids IL-17RD and IL-17RD-SEFIR were generated by subcloning the IL-17RD and SEFIR constructs respectively into the PCDNA3.1-myc vector. Mutant constructs were generated using the Gibson assembly method^{42,43}. All mutations and PCR products were verified by DNA sequencing. Sequences of primers used for PCR and details about cloning strategies are available upon request.

4.7.2 Cell culture

HEK293T and A549 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. MC-38 cells were obtained from Kerfast. The cells were cultured in DMEM media supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. The cells were used at low passages and routinely tested for mycoplasma contamination.

4.7.3 RNA interference

Cells were transfected with 100 nM of SMARTpool ON-Target Plus siRNAs against mouse or human IL-17RD (L-065001-01-0005 or L-007946-02-0005, Dharmacon) using Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies). All transfections were carried out according to the manufacturer's protocol.

4.7.4 Poly(I:C) and poly(dA:dT) transfections and overlay, and SeV infection

Cells were transfected with 2ug/ml poly(I:C) or poly(dA:dT) using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). All transfections were carried out according to the manufacturer's protocol. For the overlay condition, 5ug/ml poly(I:C) was added directly to the media. Cells were infected with 200HAU/ml of Sendai virus for the indicated times.

4.7.5 Real time quantitative PCR

Total RNA was isolated using the RNeasy isolation kit (Qiagen) and converted to cDNA using the Maxima first-strand cDNA synthesis kit with dsDNase (Thermo Fisher Scientific). Gene expression was measured using assays designed for the Universal ProbeLibrary system⁴⁴ as described⁴⁵. Primer sequences are listed in Supplementary Table 1.

4.7.6 Luciferase assay

HEK293T cells were seeded in 48-well plates and co-transfected with 300 ng of TRIF, RIG-I or cGAS/STING and IL-17RD expression plasmid, NF-kB or IRES-luciferase (firefly luciferase reporter) and pRL-TK (Renilla luciferase control) at a ratio 1:2:1 using calcium-phosphate. After 24 h, the cells were lysed in 100 μ L luciferase buffer and the firefly and Renilla luciferase activities were assayed using the Dual-Luciferase Reporter System (Promega) on a LUMIstar Omega microplate reader (BMG LABTECH).

4.7.7 Immunoprecipitation and immunoblotting

For immunoprecipitation, cells were washed once in phosphate-buffered saline and lysed in IP buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 0.5% NP-40, 0.2 mM sodium orthovanadate and protease inhibitors). Proteins (2 mg) were incubated overnight with 1 μ l of myc antibody together with 20 μ l of Protein G agarose beads (GE Healthcare). After 5 washes in IP buffer, the beads were

resuspended in 2X Laemmli's buffer and subjected to immunoblotting analysis as described previously ⁴⁶.

4.7.8 Mice

I17rd mutant mouse model has been described ⁴⁷. The mice were backcrossed for more than 10 generations to the C57BL/6J genetic background to establish a congenic strain. All mice were bred under standard conditions at the Institute for Research in Immunology and Cancer. The mice were housed under specific pathogen-free conditions in filter-topped isolator cages under a 12/12 hour light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. Animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the relevant local animal welfare agencies, and all experiments were approved by the Canadian Council on Animal Care (CCAC).

4.7.9 VSV challenge mouse model (to be done)

Male mice were used at 8 weeks of age. Mice were injected through the tail vein with $2 \cdot 10^7$ plaque forming units (PFU)/g of body weight for survival rate and $1 \cdot 10^7$ PFU/g for further analysis described below. For survival rate analysis, mice were monitored every 6 hours post injection (hpi) for 36 hours. Mice were sacrificed when classical end points were reached. For viral load in organs, mice were sacrificed 12 hpi. Liver, spleen and lungs were washed with PBS and snap frozen in liquid nitrogen. Quantification of viral load in the organs was performed by qPCR with specific primers described in Table S1. For estimation of the antiviral response in PBMC, mice were sacrificed 6 hpi, PBMC were isolated using percoll (sigma) and mRNA levels of IFN, ISG and IFIT were quantified by qPCR with specific primers described in Table S1.

4.7.10 Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with GraphPad Prism 8.0. Values are reported as mean \pm SEM or SD as indicated. A two-tailed Student's t test was applied when comparing two experimental groups. The p value is indicated on the figures or in the

legend. Survival curves were generated by the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.

4.8 Acknowledgement

We thank P. Melançon for qPCR analysis. We also thank M. Servant for reagents and critical comments and discussion. C.G. is recipient of a studentship from the Fonds de recherche Santé Québec. S.M. held the Canada Research Chair in Cellular Signaling. Work in the Meloche laboratory was supported by a grant from the Cancer Research Society.

4.9 References

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
2. Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991;351(6325):355-356.
3. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-397.
4. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099-1103.
5. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999;11(4):443-451.
6. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 2002;169(1):10-14.
7. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*. 2001;13(7):933-940.
8. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-738.
9. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303(5663):1526-1529.
10. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-745.

11. Hidmark A, von Saint Paul A, Dalpke AH. Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *J Immunol.* 2012;189(6):2717-2721.
12. Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.* 2003;5(9):581-592.
13. Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol.* 2003;24(12):652-658.
14. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 2004;5(7):730-737.
15. Kawai T, Takahashi K, Sato S, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol.* 2005;6(10):981-988.
16. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell.* 2005;122(5):669-682.
17. Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, et al. TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem.* 2008;283(52):36211-36220.
18. Liu X, Wang Q, Pan Y, Wang C. Sensing and responding to cytosolic viruses invasions: An orchestra of kaleidoscopic ubiquitinations. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(3):379-387.
19. Chan YK, Gack MU. RIG-I-like receptor regulation in virus infection and immunity. *Curr Opin Virol.* 2015;12:7-14.
20. Gack MU, Shin YC, Joo CH, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature.* 2007;446(7138):916-920.

21. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe*. 2010;8(6):496-509.
22. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):556-567.
23. Tsang M, Friesel R, Kudoh T, Dawid IB. Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol*. 2002;4(2):165-169.
24. Furthauer M, Lin W, Ang SL, Thisse B, Thisse C. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol*. 2002;4(2):170-174.
25. Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell*. 2004;7(1):33-44.
26. Kovalenko D, Yang X, Chen PY, et al. A role for extracellular and transmembrane domains of Sef in Sef-mediated inhibition of FGF signaling. *Cell Signal*. 2006;18(11):1958-1966.
27. Sun X, Wang Y, Yang S, Ren F, Xia Y, Chang Z. Activation of TAK1 by Sef-S induces apoptosis in 293T cells. *Cell Signal*. 2013;25(10):2039-2046.
28. Yang X, Kovalenko D, Nadeau RJ, et al. Sef interacts with TAK1 and mediates JNK activation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2004;279(37):38099-38102.
29. Rong Z, Wang A, Li Z, et al. IL-17RD (Sef or IL-17RLM) interacts with IL-17 receptor and mediates IL-17 signaling. *Cell Res*. 2008;19(2):208-215.
30. Mellett M, Atzei P, Horgan A, et al. Orphan receptor IL-17RD tunes IL-17A signalling and is required for neutrophilia. *Nat Commun*. 2012;3:1119.
31. Su Y, Huang J, Zhao X, et al. Interleukin-17 receptor D constitutes an alternative receptor for interleukin-17A important in psoriasis-like skin inflammation. *Sci Immunol*. 2019;4(36).

32. Mellett M, Atzei P, Bergin R, et al. Orphan receptor IL-17RD regulates Toll-like receptor signalling via SEFIR/TIR interactions. *Nat Commun.* 2015;6:6669.
33. Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, et al. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med.* 2004;199(12):1641-1650.
34. Bugge M, Bergstrom B, Eide OK, et al. Surface Toll-like receptor 3 expression in metastatic intestinal epithelial cells induces inflammatory cytokine production and promotes invasiveness. *J Biol Chem.* 2017;292(37):15408-15425.
35. Rong Z, Wang A, Li Z, et al. IL-17RD (Sef or IL-17RLM) interacts with IL-17 receptor and mediates IL-17 signaling. *Cell Res.* 2009;19(2):208-215.
36. Fuchs Y, Brunwasser M, Haif S, et al. Sef is an inhibitor of proinflammatory cytokine signaling, acting by cytoplasmic sequestration of NF-kappaB. *Dev Cell.* 2012;23(3):611-623.
37. Korsensky L, Haif S, Heller R, et al. The tumor suppressor Sef is a scaffold for the classical NF-kB/RELA:P50 signaling module. *Cell Signal.* 2019;59:110-121.
38. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med.* 2008;205(7):1601-1610.
39. Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem.* 2009;284(2):807-817.
40. Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J Biochem.* 2012;151(1):5-11.
41. Kato H, Fujita T. RIG-I-like receptors and autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol.* 2015;37:40-45.

42. Kalva S, Boeke JD, Mita P. Gibson Deletion: a novel application of isothermal in vitro recombination. *Biol Proced Online*. 2018;20:2.
43. Gibson DG, Smith HO, Hutchison CA, 3rd, Venter JC, Merryman C. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nat Methods*. 2010;7(11):901-903.
44. Loo YM, Fornek J, Crochet N, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol*. 2008;82(1):335-345.
45. Soulez M, Saba-El-Leil MK, Turgeon B, et al. Reevaluation of the Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase 3 in Perinatal Survival and Postnatal Growth Using New Genetically Engineered Mouse Models. *Mol Cell Biol*. 2019;39(6).
46. Duhamel S, Hebert J, Gaboury L, et al. Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation. *Cancer Res*. 2012;72(3):626-635.
47. He Q, Yang X, Gong Y, et al. Deficiency of Sef is associated with increased postnatal cortical bone mass by regulating Runx2 activity. *J Bone Miner Res*. 2014;29(5):1217-1231.

4.10 Additional Information

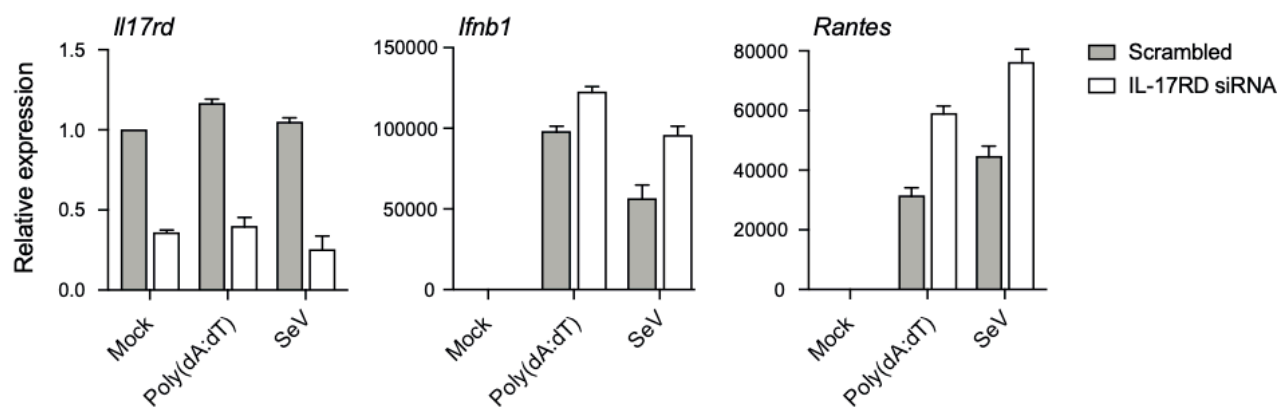


Figure S1. – IL-17RD suppresses RIG-I mediated immune response in A549. A549 cells were transfected with control or *Il17rd* pooled siRNAs for 48 hours and then with poly(dA:dT) or infected with SeV for 3 hours. Relative mRNA expression levels of NF- κ B and IRF targets were monitored by qPCR (n=1). Data are means \pm SD from technical triplicate.

Tableau 1. – List of primer sequences used for qPCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Il17rd</i>	CTTCAGGCGGAGGACTTG	CCCTGGAGAAACGTTTTGG
<i>Ifnb</i>	CACAGCCCTCTCCATCAACTA	CATTTCCGAATGTTTCGTCCT
<i>Rantes</i>	CCTACTCCCCTCGGTCCT	TTTCTTGGGTTTGCTGTGC
<i>VSV</i>	GATAGTACCGGAGGATTGACGACTA	TCAAACCATCCGAGCCATTG
<i>IFIT1</i>	TCCTGATTTCTTTTCCCAGGT	GGGTCAGAAAGACCAGAAAGAA
<i>Gapdh</i>	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
<i>Hprt</i>	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC

Chapitre 5

5 Discussion

L'objectif global de cette thèse était de déterminer le potentiel suppresseur de tumeur d'IL-17RD *in vivo*. Premièrement, parce qu'aucune étude chez la souris ne faisait état du rôle potentiel d'IL-17RD dans la tumorigénèse, nous avons utilisé un premier modèle de tumorigénèse spontanée en établissant une cohorte longitudinale de souris WT, *Il17rd^{+/-}* et *Il17rd^{-/-}*. Cette approche, reposant entre autres sur l'accumulation d'événements mutagènes au cours du temps pour induire une carcinogénèse nous a permis de confirmer, pour la première fois, le rôle suppresseur de tumeur d'IL-17RD *in vivo* (**Chapitre 2**). De manière intéressante, à travers cette étude, nous avons démontré que IL-17RD était capable (i) de protéger les souris du développement de tumeurs solides d'origine épithéliale (p. ex., le côlon) et de sarcomes, (ii) de contrôler la transcription de cytokines et chimiokines dans une variété de tissus au court du temps. De plus, de manière surprenante, aucune altération des voies de signalisation des MAPK n'a été observées dans ce modèle. Deuxièmement, pour approfondir certaines de ces observations, notamment l'induction de tumeurs colorectales, et l'augmentation de la production d'effecteurs pro-inflammatoires dans les tissus intestinaux, nous avons utilisé un modèle plus spécifique et bien caractérisé de cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse¹, combiné à une analyse transcriptomique des ARNs totaux présents dans les tumeurs récoltées. Grâce à cette étude, nous avons été les premiers à montrer *in vivo* qu'IL-17RD protège contre la tumorigénèse colorectale associée à la colite dans le modèle AOM-DSS (**Chapitre 2**). Aucune altération de prolifération, ou des voies de signalisation mitogéniques n'a été observée dans ce modèle. Cependant, une inflammation accrue a été mise en évidence dans les tumeurs *Il17rd^{-/-}*, suggérant ainsi une augmentation de la tumorigénèse via une inflammation chronique exacerbée. Troisièmement, nous avons étudié le rôle potentiel d'IL-17RD dans la réponse immunitaire innée antivirale. Ainsi, nous montrons *in vitro* qu'IL-17RD est capable d'inhiber la réponse antivirale au virus à ARN médiée par RIG-I via une potentielle interaction avec le récepteur cytoplasmique RIG-I (**Chapitre 4**).

Le travail effectué dans cette thèse contribue à approfondir nos connaissances sur le rôle d'IL-17RD dans la tumorigénèse et la réponse immunitaire innée. Nous montrons que la perte d'IL-17RD *in vivo* augmente significativement la tumorigénèse en induisant la synthèse accrue de cytokines et chimiokines dans deux modèles différents. La synthèse des cytokines et chimiokines est notamment associée aux voies de signalisation des TLRs et de l'IL-17 dans le modèle AOM-DSS. De plus, nous avons aussi identifié une nouvelle fonction d'IL-17RD en tant que régulateur des voies de signalisation de l'immunité innée induite par les récepteurs cytoplasmiques, notamment la voie de signalisation RIG-I impliquée dans la réponse immune antivirale. Toutefois, encore beaucoup de travail est nécessaire afin de comprendre les tenants et aboutissants de l'impact d'IL-17RD sur la tumorigénèse et la réponse antivirale. Ainsi, dans les prochaines sections, nous soulignerons l'intérêt des modèles utilisés pour cette étude et leurs limites, ainsi que la découverte des nouvelles caractéristiques du gène suppresseur de tumeur *Il17rd* qu'ils ont permise. Deuxièmement, nous discuterons de stratégies expérimentales additionnelles nécessaires pour répondre aux nouvelles interrogations que le modèle AOM-DSS soulève. Finalement, nous élargirons le débat sur quelques autres fonctions observées pour IL-17RD, notamment dans le métabolisme et la réponse antivirale, et nous verrons comment l'étude de ces phénotypes s'intègrent potentiellement dans une meilleure compréhension de maladies et du cancer associé à la perte d'IL-17RD.

5.1 Deux modèles indépendants pour démystifier le rôle d'IL-17RD dans la tumorigénèse

5.1.1 La lignée de souris knock out pour *Il17rd* : caractérisation, avantages et inconvénients

Les souris WT et *Il17rd*^{-/-} (aussi appelées souris *KST223*) utilisées dans les modèles de notre étude ont été obtenues à partir de cellules souches embryonnaires générées par la technique de « piégeage de gène » par BayGenomics^{2,3}. Sa première caractérisation a été réalisée dans le **développement du tronc cérébral auditif**. En effet, deux études démontrent que la régulation de la voie FGF par IL-17RD influence le développement et les fonctions du tronc cérébral auditif, et que la perte du récepteur induit des défauts au noyau cochléaire^{4,5}. Le laboratoire du Dr. Robert E. Friesel a ensuite caractérisé le modèle dans un contexte de **développement osseux** en montrant que la perte d'IL-17RD est associée à une augmentation de la masse osseuse corticale postnatale en régulant l'activité du gène *Runx2*⁶. Parallèlement, trois autres études se focalisent sur le rôle du gène *Il17rd* dans la régulation de l'**inflammation**. Notamment, les souris *Il17rd*^{-/-} présentent (i) une diminution de recrutement de neutrophiles dans les poumons en réponse à l'IL-17A⁷, (ii) une létalité induite par l'activation des TLRs augmentée⁸ et (iii) un phénotype de maladie de psoriasis induite par IMQ diminué^{9,10}. A noter que cette dernière étude a été menée sur une lignée issue du German Genetrap Consortium⁷, générée aussi par « piégeage de gène ».

L'avantage principal de la lignée *Il17rd*^{-/-} est qu'elle permet d'étudier la délétion totale du gène à l'âge adulte, les souris étant **viabiles et fertiles**. L'étude de perte de fonction d'un gène est particulièrement pertinente pour un potentiel gène suppresseur de tumeur. Par ailleurs, l'utilisation du modèle murin en comparaison à des cellules *in vitro* est cruciale pour l'étude d'un gène impliqué dans la tumorigénèse. En effet, une masse tumorale est composée non seulement d'une population hétérogène de cellules cancéreuses mais aussi d'une variété de cellules hôtes résidentes et infiltrantes, de

facteurs sécrétés et de protéines de la matrice extracellulaire, appelé le **microenvironnement**¹¹⁻¹³. Ainsi, la progression tumorale est profondément influencée par l'interaction entre les cellules cancéreuses et son environnement.

Néanmoins, l'avantage d'un modèle murin complexe associé à un knock-out complet (c.à-d. dans tous les types cellulaires) représente également un inconvénient majeur lors de l'étude d'une protéine telle qu'IL-17RD qui est exprimée de manière ubiquitaire par les populations de cellules non hématopoïétiques et hématopoïétiques (**Figure S1A et C, page 115**). En effet, il a été rapporté que la délétion dans chacun de ces deux compartiments indépendamment peut avoir un impact *in vitro* sur la carcinogénèse et l'inflammation, respectivement. Idéalement, un modèle de **souris conditionnelles** pour le gène d'intérêt permettrait de compléter une étude sur une délétion complète du gène. Malheureusement, aucune souris conditionnelle pour le gène *Il17rd* n'est disponible actuellement, ce qui peut représenter un frein quant à la caractérisation de son mécanisme d'action. Nous verrons que certains modèles alternatifs (p. ex., allogreffes syngéniques, souris chimères de la moelle osseuse) pourraient permettre de contourner cette limite (**section 5.4.1**).

Globalement, très peu de littérature est disponible sur la lignée *Il17rd*^{-/-}. De plus, le rôle d'IL-17RD n'a pas été caractérisé *in vivo*, ni dans l'étude de la régulation des voies mitogéniques, ni dans l'étude de la carcinogénèse, pourtant vastement étudiés *in vitro*. Pour apporter des éléments de réponses dans ces domaines, nous avons décidé d'utiliser deux modèles distincts, (i) une cohorte longitudinale de vieillissement et (ii) un modèle de CAC induit par l'AOM-DSS. La description des avantages et limites de chacun des modèles utilisés nous permettra de mieux apprécier les découvertes qu'ils ont engendrées (**section 5.2**), mais aussi les nouveaux questionnements qu'ils soulèvent (**section 5.4**) dans le contexte actuel des connaissances.

5.1.2 Une cohorte longitudinale de vieillissement : avantages et inconvénients

Afin de caractériser les souris *Il17rd^{-/-}* dans un contexte de carcinogénèse spontanée, nous avons utilisé une cohorte longitudinale de souris (mâles et femelles) vieillissantes jusqu'à 24 mois. En effet, il est bien connu que l'incidence de tumeurs malignes augmente progressivement avec l'âge chez l'homme et les animaux^{14,15}. Ce modèle qui permet de caractériser une lignée au cours du temps présente de nombreux avantages et certains inconvénients.

Premièrement, alors que les « tumeurs spontanées » chez l'homme sont aussi la cause de facteurs environnementaux (p. ex., le tabac, le régime alimentaire, les radiations ultraviolet et les virus oncogéniques), chez les rongeurs de laboratoire, il est communément accepté que ces tumeurs sont issues de **néoplasie** sans exposition additionnelle à des **agents carcinogènes exogènes**¹⁶, ce qui permet de bien apprécier l'impact de la perte d'IL-17RD au cours du vieillissement et du développement tumoral. Deuxièmement, les mutations spécifiques présentes dans les différents fonds génétiques des lignées de souris leur confèrent certaines caractéristiques propres. La lignée C57BL/6J est la plus commune, utilisée dans 90% de la recherche biomédicale et particulièrement pour des études sur le métabolisme¹⁷⁻¹⁹, diabète²⁰, immunologie²¹, comportement²² et en oncologie²³. Ainsi, le modèle de **vieillissement sur fond C57B/6J** est couramment utilisé pour l'étude de la carcinogénèse spontanée en condition de vieillissement^{23,24}. Troisièmement, il permet la caractérisation de la lignée à des temps courts et longs simplement par des mesures de certains paramètres (p. ex., poids corporel, glycémie) et le prélèvement et l'analyse d'un grand nombre d'organes afin de suivre de multiples processus (p. ex. activation des MAPKs ou de l'inflammation dans plusieurs tissus, intégrité de ces tissus). Par conséquent, ce modèle nous permet de répondre de manière générale et non contextuelle à notre hypothèse qui décrit *Il17rd* comme un gène suppresseur de tumeur et de déterminer son rôle potentiel dans plusieurs tissus à la fois.

Cependant, l'étude d'une cohorte longitudinale est un processus long et onéreux. De plus, le vieillissement est un **processus complexe** qui peut induire la tumorigénèse via plusieurs mécanismes dont, (i) l'accumulation dans les tissus de cellules à des stades tardifs de la carcinogénèse, (ii) l'induction d'altérations de l'homéostasie, en particulier, des altérations immunitaires et du système endocrinien et (iii) l'instabilité des télomères²⁵. Tous ces éléments difficilement dissociables rendent la compréhension mécanistique du phénotype compliquée à disséquer.

5.1.3 Le modèle de cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse induit par AOM-DSS : avantages et inconvénients

Pour évaluer le potentiel de suppression de tumeur d'IL-17RD dans un contexte plus spécifique, nous avons utilisé un modèle de CAC induit par AOM-DSS.

Certaines fonctions d'IL-17RD dans le cancer colorectal ont déjà été rapportées. D'abord, des travaux dans le laboratoire ont démontré que la carcinogénèse colorectale est associée à une activation et une localisation aberrante de MEK1/2 et ERK1/2 au noyau tel qu'observé dans des « tissue microarray » (TMA) de patients atteints de cancers colorectaux et dans une série de lignées de cancers colorectaux (p. ex., HCT116, SW480, COLO205), induisant une accélération des processus cellulaires associés tel que la prolifération^{26,27}. De manière intéressante, les niveaux d'IL-17RD sont diminués dans ces mêmes lignées en comparaison aux cellules épithéliales intestinales normales humaines (HIECs). IL-17RD, régulateur spatial de MEK1/2 au cytoplasme, séquestre le complexe MEK1/2-ERK1/2 au cytoplasme et représente ainsi un potentiel inhibiteur de la voie MAPK-ERK1/2 dans le cancer colorectal. De la même façon, sa surexpression dans les lignées HCT116 et COLO205 a permis de restaurer la localisation cytoplasmique normale de MEK1/2 activé, atténuant la localisation nucléaire de ERK1/2 phosphorylé et normalisant ainsi la prolifération cellulaire. Par ailleurs, la surexpression d'IL-17RD dans des cellules épithéliales intestinales de rat exprimant un mutant gain-de-fonction de Ras (IEC6-H-Ras^{v12}) inhibe dramatiquement la croissance tumorale suite à une greffe dans le flanc de souris athymiques²⁶. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle suppresseur

de tumeur d'IL-17RD dans le cancer colorectal. Paradoxalement, une seconde étude, dans un contexte spécifique de cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse chez l'homme, montre qu'IL-17RD pourrait dans ce contexte, détenir un rôle oncogénique²⁸. En effet, cette étude visant à évaluer le rôle des miARNs dans le développement néoplasique chez les patients à haut risque atteints de colite ulcéreuse, a identifié la perte d'expression de miR-193a-3p capable de cibler directement IL-17RD. Ainsi, ils démontrent qu'une régulation positive d'IL-17RD augmenterait la carcinogénèse chez des patients atteints de colite ulcéreuse²⁸. Cette controverse montre l'importance particulière de vérifier la fonction d'IL-17RD dans le cancer colorectal chez la souris.

Brièvement, le modèle AOM-DSS utilisé dans notre étude consiste en une injection d'**azoxyméthane (AOM)**, un agent pro-carcinogène induisant une succession de mutations dans les cellules du côlon, suivie d'un ou plusieurs cycles de **dextran sulfate sodium (DSS)**, un polysaccharide infligeant des dommages à la barrière épithéliale et une inflammation chronique au niveau du côlon mimant la colite ulcéreuse chez l'humain²⁹. Le modèle AOM-DSS est un modèle intéressant mais également assez complexe qui présente ainsi des avantages et certaines limites.

Premièrement, le modèle AOM-DSS est décrit comme un modèle murin **fiable** et **pratique** qui reproduit plusieurs aspects du cancer colorectal associé à la colite chez l'humain (p. ex., tumeurs dans la partie distale du colon, histopathologies identiques) en déployant des caractéristiques moléculaires similaires (p. ex., dérégulation des voies Wnt/APC/ β -catenine, K-Ras, p53, TGF- β , Cox-2)²⁹. Deuxièmement, le modèle AOM-DSS, est une variation du modèle standard de colite ulcéreuse qui nécessite une longue exposition au DSS ou plusieurs cycles afin d'induire une faible incidence de tumeur³⁰. Ainsi, en plus de permettre l'observation de tumeurs plus **rapidement**, le modèle AOM-DSS permet d'examiner le **rôle de l'inflammation** dans la carcinogénèse du côlon.

Cependant, alors que ce modèle est d'un grand intérêt dans l'étude du développement tumoral dans un environnement d'inflammation, il présente des limites. La carcinogénèse est connue comme étant un **processus complexe** à plusieurs étapes. Ce modèle à deux composantes (AOM et DSS) a l'inconvénient d'induire plusieurs

phénomènes en un court temps tels que (i) des **mutations** dans certains oncogènes et/ou gènes suppresseurs de tumeurs et une dérégulation des voies associées (p. ex. apoptose), (ii) une **inflammation chronique** induite par le DSS et par conséquent (iii) une **réparation tissulaire** via la production de TNF, TGF- β et EGF²⁹, rendant les mécanismes associés difficiles à disséquer au moment du sacrifice.

Des alternatives à ces modèles pour l'étude de la carcinogenèse colorectale (p.ex., modèle APC^{min/+}) seront présentées en **section 5.3.1** pour contourner certaines de ces limites.

5.2 L'identification de nouvelles caractéristiques du suppresseur de tumeur IL-17RD

Suite à sa découverte en 2002, IL-17RD a tout d'abord fait l'objet d'une dizaine d'études lui conférant un rôle inhibiteur dans la régulation de différentes voies de signalisation mitogéniques³¹⁻³³ et par conséquent dans certains processus cellulaires essentiels associés^{32,34}. Cependant, ce n'est qu'à partir de 2006 qu'IL-17RD est étudié dans un contexte de cancer grâce à des analyses d'expression dans différents types de tumeurs solides. Ainsi, des études rapportent que IL-17RD est sous-exprimé dans une variété de cancers³⁵⁻³⁸. Quelques études *in vitro* sur des processus cellulaires associés au cancer (p. ex., EMT) ont suivi^{26,37-44}, et de manière surprenante, les seules expériences menées *in vivo* ont utilisé des greffes de cellules cancéreuses dans le flanc de souris athymiques^{26,45}. Une caractérisation des souris *Il17rd*^{-/-} dans un contexte de régulation des voies mitogéniques et du cancer et l'étude de modèles d'induction de carcinogénèse en perte d'IL-17RD est un réel manquement à la compréhension du rôle d'IL-17RD suggéré.

De manière intéressante, le modèle de vieillissement nous a permis d'établir pour la première fois *in vivo* le **rôle du gène suppresseur de tumeur *Il17rd***. De plus, le modèle AOM-DSS nous a permis d'étendre son pouvoir suppresseur de tumeur à un modèle plus spécifique de CAC. De par l'utilisation de nos deux modèles murins distincts, notre étude a non seulement permis de démystifier le rôle d'IL-17RD dans la carcinogénèse mais elle a permis d'identifier de nouvelles caractéristiques de ce gène suppresseur de tumeur.

5.2.1 *Il17rd* est un gène suppresseur de tumeur haplo-insuffisant

De manière intéressante, les courbes de survie et l'incidence tumorale observées chez les souris *Il17rd*^{+/-} et *Il17rd*^{-/-} suggèrent que le gène *Il17rd* est **haplo-insuffisant** dans la suppression tumorale, c'est à dire qu'un seul allèle ne suffit pas à la protéine pour qu'elle remplisse ses fonctions. En effet, notre étude montre que les souris *Il17rd*^{+/-} et *Il17rd*^{-/-} présentent des chances de **survies similaires** de 63% et 72%, respectivement

et une **incidence tumorale comparable** de 25% et 30,5%, respectivement (**Figure 1B-C, page 85**). La perte de la fonction d'un gène suppresseur de tumeur se produit généralement via la suppression ou l'inactivation de deux allèles, selon l'hypothèse du **modèle à double coups** du Dr. Alfred G. Knudson⁴⁶ (« two hit hypothesis»). Il est devenu clair que les mutations dans les gènes suppresseur de tumeur sont très souvent récessives au niveau d'une cellule individuelle. Par conséquent, d'après ce modèle, une mutation sur un seul allèle d'un gène suppresseur de tumeur n'est pas suffisante pour provoquer la cancérogenèse. Un exemple de gène suppresseur de tumeur suivant cette hypothèse est le gène du rétinoblastome (*Rb1*), responsable de cancer lorsque que les deux allèles sont perdus. Cependant, de nombreuses études ont identifié des gènes suppresseurs de tumeur candidats qui ne sont pas conformes à cette définition standard. Ce sont les cas plus complexes où plusieurs (4 à 6) **événements consécutifs** sont requis impliquant plus d'un gène pour le développement d'un cancer. De plus, de manière intéressante, le produit d'un seul allèle normal peut ne pas être suffisant pour remplir la pleine fonction de la protéine, se traduisant ainsi par un développement tumoral initié par la présence d'un allèle normal et un allèle inactif. La notion d'**haplo-insuffisance** est ainsi venue étoffer la théorie de Knudson. Des exemples de gènes suppresseurs de tumeur haplo-insuffisants sont p27^{Kip1} p53, DMP1 et PTEN^{47,48}.

Ainsi, notre étude permet, pour la première fois, de potentiellement classer *Il17rd* dans une catégorie spécifique des gènes suppresseurs de tumeur qui ne suivent pas l'hypothèse des deux coups de Knudson.

5.2.2 Les femelles *Il17rd*^{-/-} ont une susceptibilité accrue pour la formation de tumeurs

Notre étude a mis en évidence une deuxième caractéristique intéressante du gène *Il17rd*. En effet, nous avons observé que la perte d'IL-17RD a un impact sur le développement tumoral de manière **plus prononcée chez les femelles** que chez les mâles dans la cohorte de vieillissement (**Figure 1E, page 85**). Alors que la même proportion de mâles, quel que soit leur génotype, présente des tumeurs dans la cohorte

de 24 mois (c. à-d. 3 mâles WT et *Il17rd*^{+/-} et 4 mâles *Il17rd*^{-/-}), aucune femelle WT n' en a développé et des tumeurs ont été observées chez 6 femelles *Il17rd*^{+/-} et 7 femelles *Il17rd*^{-/-}. De plus, il est intéressant de noter que plusieurs tumeurs *Il17rd*^{+/-} (15%) et *Il17rd*^{-/-} (23%) ont été recensées au niveau du **système reproductif féminin** (p. ex., l'utérus, l'ovaire et les glandes mammaires).

De manière intéressante, le modèle AOM-DSS appliqué à une cohorte mixte de 5 mâles et de 10 femelles de chaque génotype nous a permis d'observer, encore une fois, une **inflammation accrue** chez les femelles par rapport aux mâles se traduisant par une perte de poids plus prononcée après DSS (**Figure 1A**), associée à une augmentation plus importante de la tumorigénèse chez les femelles (**Figure 1B**).

Globalement, ces résultats font d'*Il17rd* un gène suppresseur de tumeur potentiellement **dépendant du sexe**.

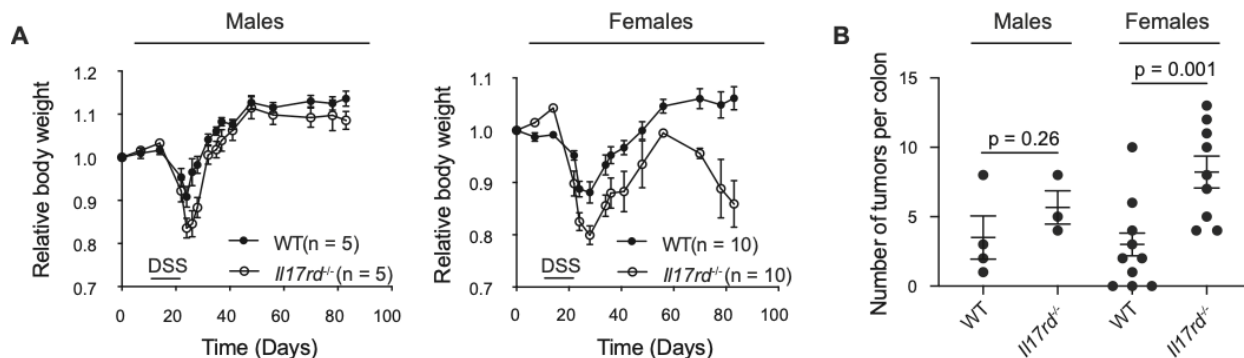


Figure 1. – Le rôle du gène *Il17rd* est dépendant du sexe chez les souris post AOM-DSS. (A) Poids corporel relatif de souris WT et *Il17rd*^{-/-} au court du protocole AOM-DSS. Les données sont des moyennes ± SEM. (B) Quantification des lésions tumorales. Les données sont des moyennes ± SEM.

De manière intéressante, plusieurs protéines agissent de manière dépendante du sexe dans la littérature. Le facteur de transcription inducible par l'interféron STAT1 est un suppresseur de tumeur dans plusieurs tumeurs malignes⁴⁹⁻⁵¹. Par ailleurs, il a été démontré que les mâles déficients en STAT1 dans les cellules épithéliales sont plus

résistants à la colite induite par le DSS que leurs contrôles alors qu'aucune différence n'est observée chez les femelles⁵². Alors que ces résultats sont en accord avec l'observation générale d'une incidence significativement plus élevée chez l'homme que chez la femme dans plusieurs cancers, notre observation semble faire **partie des exceptions**. La susceptibilité spécifique d'un sexe est due à des facteurs de comportement et d'environnement, aux signalisations des hormones et aux gènes modulant le cancer présent sur les chromosomes sexués⁵³. De plus, les réponses immunitaires et la surveillance immune au cancer sont dépendants du sexe⁵⁴. En effet, les femmes présentent des **réponses immunitaires innées et adaptatives plus fortes** que les hommes, ce qui pourrait potentiellement aller en leur faveur dans la réponse anti-tumorale mais en leur défaveur dans des cas d'auto-immunité ou d'inflammation chronique. Ainsi, il se pourrait que cette réponse accrue chez les femelles aggrave l'inflammation chronique déjà exacerbée par la perte d'IL-17RD dans notre modèle AOM-DSS.

Idéalement, ces résultats pourraient potentiellement améliorer la **valeur de pronostic** après stratification par sexe. De plus, une stratification par sexe pourrait être recommandée avant de tester l'efficacité de certains inhibiteurs de voies de l'inflammation abordés dans la **section 1.4.2** (p. ex., anti-IL-17 ou anti-IL-6).

5.2.3 Une nouvelle boucle de rétroaction positive a été identifiée

En plus du manque d'évidences sur les rôles pathophysiologiques d'IL-17RD, sa régulation reste peu étudiée. De manière intéressante, nous avons observé une perte d'expression de l'ARNm d'IL-17RD en réponse au **traitement au DSS (Figure 5F, page 95)**. Ainsi, le rôle inhibiteur d'IL-17RD dans l'inflammation observé dans notre étude (**Figure 5A-E, page 95**) et sa perte d'expression en réponse au traitement au DSS suggèrent l'identification d'une boucle de **rétroaction positive** aggravant la réponse inflammatoire et créant ainsi un environnement propice au développement tumoral. Cette boucle de rétroaction positive s'ajoute ainsi à celles observées lors de l'activation de la voie **MAPK-Ras-MEK1/2-ERK1/2 ou FGF** qui induisent également une diminution

d'expression d'IL-17RD et par conséquent une amplification des voies respectives²⁶. De nombreux gènes et voies de signalisation sont impliqués dans des boucles de rétroaction positives menant à la tumorigénèse colorectale^{55,56}. Par exemple, il a été démontré que la prostaglandine E₂, un médiateur de l'inflammation et de la régénération active la protéine associée à Yes (YAP) et une boucle de rétroaction positive afin de promouvoir la régénération du colon suite à l'induction de colite mais aussi la carcinogénèse chez la souris⁵⁷.

5.3 L'implication des voies mitogéniques et/ou de l'inflammation dans la carcinogénèse induite par la perte d'IL-17RD

Deux facteurs majeurs modulés par IL-17RD peuvent potentiellement expliquer la progression tumorale observée dans nos deux modèles. Ainsi, nous avons évalué (i) la potentielle suractivation des voies mitogéniques et/ou (ii) l'inflammation accrue induite par la dérégulation de voies de signalisation de l'immunité innée.

5.3.1 Des voies mitogéniques non altérées dans les deux modèles?

Le rôle suppresseur de tumeur potentiel de IL-17RD tel que suggéré dans la littérature repose sur ses **fonctions inhibitrices** des voies mitogéniques observées *in vitro*. Cependant, une étude de perte de fonction dans un organisme entier est cruciale pour déterminer le réel impact du gène suppresseur de tumeur sur ces voies *in vivo*. Ainsi, nous avons étudié l'activation des voies mitogéniques dans nos deux modèles.

Globalement, la perte d'IL-17RD n'a montré **aucun impact visible** sur les voies mitogéniques *in vivo*. Premièrement, nous avons regardé l'activation de la voie des MAPK-MEK1/2-ERK1/2 dans la cohorte longitudinale par immunobuvardage de la forme phosphorylée de ERK1/2 (p-ERK1/2). Aucune différence n'a été observée dans les tissus de l'intestin des animaux WT et *Il17rd^{-/-}* de 24 mois (**Figure 2**).

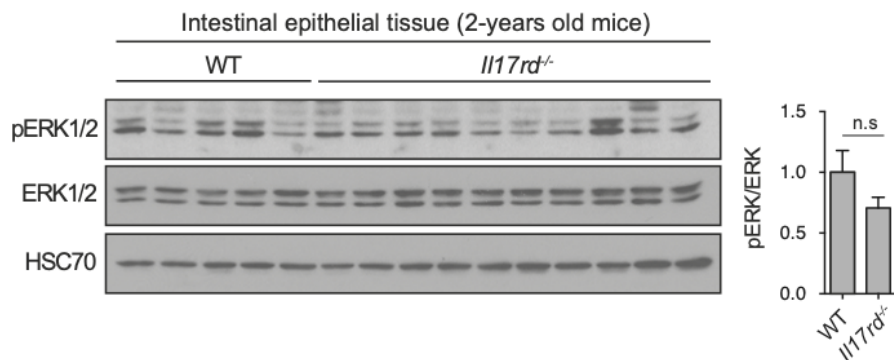


Figure 2. – La perte de IL-17RD n’altère pas la phosphorylation de ERK1/2 chez les souris en vieillissement. A gauche, immunobuvardage de p-ERK1/2 et des contrôles associés ERK1/2 et HSC70 dans les tissus de l’épithélium intestinal de souris WT et *Il17rd^{-/-}* âgées de 2 ans. A droite, quantification de l’expression relative de p-ERK1/2.

Deuxièmement, l’analyse immunohistochimique de p-ERK1/2 dans les tumeurs WT et *Il17rd^{-/-}* issues du protocole AOM-DSS n’a montré aucune différence d’activation de la voie MEK1/2-ERK1/2 non plus (**Figure S2, page 116**). Cela peut s’expliquer par le fait que les tissus ont subi de nombreuses aberrations génétiques conduisant à des signaux d’hyper-prolifération et de survie ne nous permettant pas de détecter d’impact majeur sur le long terme. Il est plus important de quantifier ces paramètres dans les tissus naïfs (non affectés) de l’intestin grêle et du colon de souris WT et *Il17rd^{-/-}* pour évaluer comment cette dernière lignée est prédisposée au développement tumoral. Par conséquent, ces analyses ont été complétées par une analyse plus approfondie de la barrière épithéliale dans la cohorte longitudinale à des temps plus courts, ainsi qu’une analyse d’organoïdes de l’intestin grêle et du colon et des études *in vitro* dans diverses lignées colorectales cancéreuses. Cependant, aucune différence de prolifération ou d’activation de la voie MEK1/2-ERK1/2 n’a été observée à l’état basal (**Figure 3, page 89**).

Pour expliquer ces résultats apparemment divergents avec la littérature, nous devons prendre en compte les différences de phénotypes conférées par (i) les perturbations génétiques de gain de fonction et perte de fonction, (ii) les mécanismes

compensatoires menant à la réorganisation des voies de signalisation mitogéniques et (iii) le rôle spécifique au type et/ou contexte cellulaire d'IL-17RD.

Premièrement, il est important de noter que la majorité des expériences *in vitro* sur le rôle d'IL-17RD dans les voies mitogéniques ont été menées en **gain de fonction**, permettant ainsi une restauration de phénotypes normaux dans des cellules d'origines cancéreuses. Deuxièmement, une régulation puissante des voies mitogéniques impliquées dans des processus essentiels à la cellule est nécessaire pour le bon fonctionnement de celle-ci. Par conséquent, des mécanismes de **compensation** sont mis en place pour palier de potentiels dérèglements. En effet, les voies de signalisation telles que Ras/MEK/ERK1/2, JNK et PI3K-mTOR, originellement modélisées en signalisations linéaires activées par des stimuli différents, sont capables de communiquer et de se compenser entre elles^{58,59}. Finalement, notre étude représente la première analyse d'un **tissu spécifique** de manière continue, à partir de souris, organoïdes cultivés *ex vivo* et cellules *in vitro* menant à des conclusions convergentes vers un rôle mineur ou potentiellement compensé d'IL-17RD dans les voies mitogéniques.

Ainsi l'inhibition des voies mitogéniques par IL-17RD largement décrite dans la littérature ne semble pas être le facteur principal à l'origine de son potentiel en tant que suppresseur de tumeur à l'état basal. Néanmoins, un impact de la perte d'IL-17RD au temps d'initiation de la tumorigénèse ne peut pas être exclu dans ces modèles. Afin de correctement répondre à cette question, l'utilisation d'un modèle de carcinogénèse colorectale spontanée (p. ex., modèle APC^{min/+}) serait plus appropriée. Le **modèle de néoplasie multiple intestinale APC^{min/+}** présente une mutation au locus du gène suppresseur de tumeur APC et induit la formation d'adénomes intestinaux spontanés⁶⁰. Ce modèle impliquant une seule mutation spécifique est moins complexe que le modèle de vieillissement ou le modèle AOM-DSS dans lesquels la dérégulation des voies mitogéniques par IL-17RD peut être camouflée par d'autres mécanismes plus importants.

5.3.2 Une inflammation accrue dans les deux modèles

IL-17RD a aussi fait l'objet de plusieurs travaux lui conférant un rôle dans la régulation de l'immunité innée et l'inflammation, notamment en régulant les voies de signalisation des TLRs et de l'IL-17. Ainsi, nous avons étudié la production de cytokines et chimiokines dans nos deux modèles. Nous avons observé une augmentation de l'inflammation dans les deux modèles (**Figure 4, page 92 et Figure S4, page 118**).

Premièrement, il est difficile de conclure sur un mécanisme précis à partir d'une cohorte longitudinale de vieillissement, puisque plusieurs changements cellulaires, hormonaux et métaboliques sont observés avec l'âge. Cependant, nous avons observé une augmentation de **cytokines pro-inflammatoires** *Il1b*, *Il6*, *Tnf* et *Tgfb1* dans les tissus des souris *Il17rd^{-/-}* de 18 mois et 24 mois (**Figure S4, page 117**). De plus, la vieillesse peut être caractérisée par une inflammation chronique de bas grade, ce phénomène est appelé « **inflammageing** »⁶¹. Par conséquent, interférer avec la signalisation inflammatoire chez la souris peut donner lieu à une accélération ou un retard des phénotypes liés à l'âge et le cancer. Ainsi, cela est le cas des souris *Nfkb^{-/-}* et des souris déficientes en IL-10 (*IL-10^{tm/tm}*). De par la fonction de régulateur des voies de l'inflammation conférée à IL-17RD et l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires dans le modèle de vieillissement, nous pouvons supposer que cette inflammation chronique de bas grade induite par l'âge est accentuée chez les souris *Il17rd^{-/-}*, et pourrait être un élément à l'origine de la tumorigénèse observée. En effet, il existe maintenant de nombreuses preuves d'un rôle critique de l'inflammation chronique dans l'étiologie de nombreux cancers^{62,63}. De manière intéressante, les tissus affectés par la tumorigénèse (**Figure 1F, page 85**) sont quasiment tous localisés à la **frontière avec l'environnement** extérieur (p. ex. muqueuses utérines, poumons, muqueuses intestinales) où la présence de bactéries et autres pathogènes commensaux représentent une menace et peuvent facilement induire un processus inflammatoire. Deuxièmement, il n'est pas encore entièrement clair si l'inflammation observée est le résultat **direct** de la perte d'IL-17RD sur les signalisations de l'immunité innée ou si elle est le résultat **indirect** de l'impact d'IL-17RD sur un événement intermédiaire (p. ex., activation de voies oncogéniques). En

effet, l'inflammation peut être initiée par plusieurs événements dont des **mutations oncogéniques**. Finalement, de manière intéressante et complémentaire, l'observation d'une inflammation accrue robuste induite par les signalisations TLRs et IL-17 dans les tumeurs *Il17rd^{-/-}* post AOM-DSS suggère très fortement un impact direct d'IL-17RD sur les voies de signalisations de l'immunité innée pour induire l'inflammation (**Figure 4, page 92 et Figure S5, page 118**).

Ainsi, c'est la première fois que le rôle d'IL-17RD dans la **carcinogénèse** est relié (directement ou indirectement) à son rôle dans la **régulation de l'inflammation**. Les modèles utilisés jusqu'à présent pour l'étude d'IL-17RD dans l'inflammation ne permettent pas d'adresser l'induction de la carcinogénèse. En effet, les modèles de maladie de psoriasis induite par imiquimob (IMQ) ou de stimulation à l'IL-17 et poly(I :C) sur des temps courts ne font pas l'objet d'un risque accru pour le développement de tumeur et ne représentent pas de bons modèles pour cette étude.

5.4 Le modèle AOM-DSS soulève plusieurs questions

L'inflammation relative à la production de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires peut être originaire d'une réponse immunitaire innée locale induite par les **cellules épithéliales** au site de l'infection et/ou par les **cellules dendritiques** et **macrophages résidents**. De plus, elle peut aussi être initiée par les cellules immunitaires locales et périphériques pour induire un recrutement de cellules spécifiques et une réponse immune adaptative plus forte et appropriée.

5.4.1 Une piste vers le ou les compartiment(s) responsable(s) de l'impact d'IL-17RD sur la tumorigénèse

Alors que notre modèle AOM-DSS nous a permis d'évaluer le rôle général d'IL-17RD dans le cancer colorectal, il ne nous permet pas de déterminer le compartiment responsable de cette fonction. En effet, la fonction de suppresseur de tumeur d'IL-17RD observée dans le CAC induit par AOM-DSS pourrait être liée à un double effet dans les **cellules tumorales** et les **cellules immunitaires stromales** ou dans un seul des deux

compartiments exclusivement. De manière intéressante, les deux compartiments ont fait l'objet d'études indépendantes *in vitro* dans la compréhension de la régulation de l'inflammation par IL-17RD, démontrant ainsi qu'ils peuvent potentiellement être tous les deux impactés par la perte d'IL-17RD dans notre modèle. En effet, des fonctions d'IL-17RD dans l'inflammation ont été décrites dans les macrophages issus de la moelle osseuse (BMDMs) et autres cellules immunitaires (p. ex. PBMCs, DCs)⁷⁻⁹ et dans les cellules épithéliales ou fibroblastes telles que les MEFs⁸. Par ailleurs, les niveaux d'expression d'IL-17RD sont plus élevés dans les cellules non hématopoïétiques par rapport aux cellules hématopoïétiques (**Figure S1A et C, page 115**). Ces données suggèrent un rôle inhibiteur d'IL-17RD plus dominant dans les cellules épithéliales et plus subtil dans les cellules hématopoïétiques, ce qui reste à vérifier.

Des résultats du laboratoire ont montré que la surexpression d'IL-17RD dans une lignée épithéliale colorectale (IEC6) permettait une diminution de la croissance de tumeurs chez la souris²⁶. Dans le but d'apporter des éléments de réponses aux compartiments impliqués et d'étudier IL-17RD en perte de fonction, nous avons utilisé un modèle d'**allogreffes syngéniques** de cellules cancéreuses colorectales. Premièrement, nous avons injecté des cellules MC38 traitées avec deux shARNs dans le flanc de souris C57BL/6J WT afin de déterminer le pouvoir suppresseur de tumeur d'IL-17RD **intrinsèque** aux cellules tumorales épithéliales (**Figure 3A**). Parallèlement, nous avons injecté des cellules MC38 WT dans le flanc de souris WT ou *Il17rd*^{-/-} afin de déterminer le pouvoir suppresseur de tumeur d'IL-17RD dans le **microenvironnement** de la tumeur (**Figure 3B**).

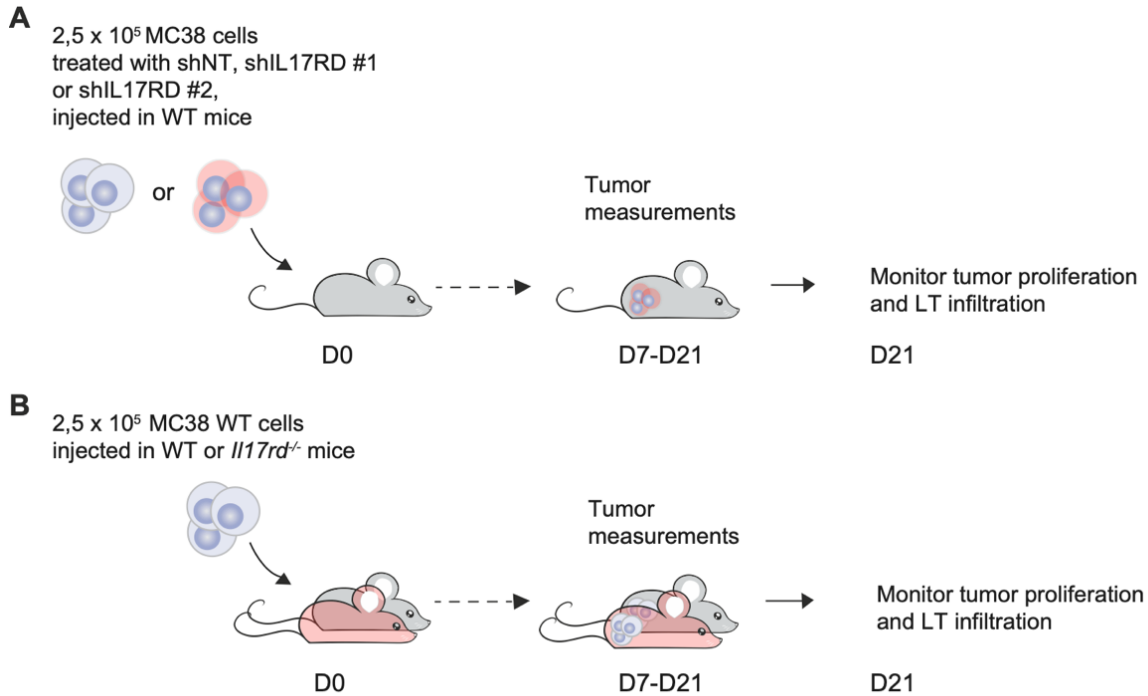


Figure 3. – Allogreffes syngéniques pour l’identification des rôles intrinsèques à la cellule tumorale et immunitaires dans la tumorigénèse induite par la perte du gène *Il17rd*. (A) Représentation schématique des allogreffes syngéniques de cellules MC-38 traitées aux shARN chez des souris C57BL6J sauvages. (B) Représentation schématique des allogreffes syngéniques de cellules MC-38 sauvages chez les souris C57BL6J sauvages ou *Il17rd*^{-/-}.

De manière étonnante, la perte d’IL-17RD dans les cellules tumorales épithéliales n’a pas induit d’augmentation de la tumorigénèse comme cela aurait pu être attendu, de par le rôle inhibiteur d’IL-17RD sur les voies mitogéniques. Contrairement, les tumeurs déficientes en IL-17RD ont même une **croissance diminuée** par rapport aux tumeurs shNT (**Figure 4A**). Cette observation, confirmée par David H. Peng et ses collègues⁴⁵, pourrait être le résultat d’un phénomène de **sénescence induite par les oncogènes (OIS)**⁶⁴.

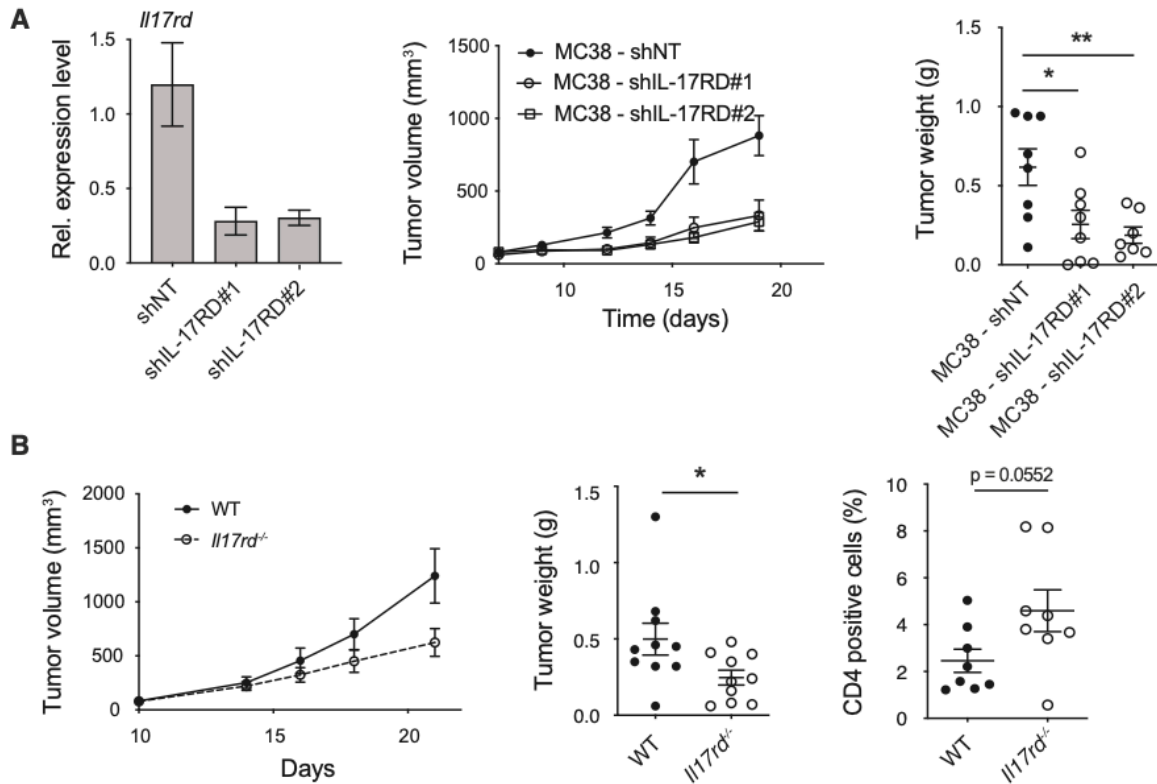


Figure 4. – La perte du gène *Il17rd* dans le compartiment épithélial ou immunitaire induit une réponse anti-tumorale aux allogreffes syngéniques chez la souris. (A) Panneau de gauche, Analyse q-PCR de l'expression du gène *Il17rd* dans les cellules MC-38 traitées aux shNT, shIL-17RD#1 et #2. Panneau du milieu, le volume des tumeurs a été mesuré au court du temps. Panneau de droite, le poids des tumeurs a été mesuré au sacrifice. (B) Panneau de gauche, le volume des tumeurs a été mesuré au court du temps. Panneau du milieu, le poids des tumeurs a été mesuré au sacrifice. Panneau de droite, quantification de la proportion de CD4 a été effectuée suite à un marquage immunohistochimique.

L'expérience inverse démontre que la perte d'IL-17RD dans l'environnement tumoral induit aussi une **diminution de la progression tumorale** avec une tendance à une **infiltration accrue de lymphocytes T CD4+** (Figure 4B). Qu'une réponse immune soit pro- ou anti-tumorale repose sur un **équilibre délicat** entre le système immunitaire inné et adaptatif. Une réponse immune adaptative bien régulée et saine est considérée comme anti-tumorale, alors qu'une réponse innée effrénée ou une réponse adaptative inappropriée peuvent mener à de l'inflammation chronique et un environnement pro-

tumoral. Le cas d'allogreffe syngénique qui atteint un point limite vers 19-21 jours post injection induit une réponse potentielle du système immunitaire accrue à une progression tumorale intrinsèque aux cellules épithéliales. Ainsi, dans ces conditions, on pourrait penser que le recrutement accru de CD4⁺ induit par la perte d'IL-17RD permet une réponse anti-tumorale renforcée. Contrairement, dans un contexte AOM-DSS, une inflammation prolongée accrue induit une inflammation chronique aberrante menant à la tumorigénèse. A noter que certaines expériences sont encore nécessaires afin de déterminer le mécanisme sous-jacent à la potentielle augmentation de cellules T CD4⁺ puisque celle-ci ne peut pas être expliquée par un changement de proportion de ces cellules à l'état basal (**Figure S1D. p.114**).

Ainsi, ces résultats ne nous permettent pas de caractériser la fonction suppresseur de tumeur d'IL-17RD dans un contexte d'inflammation chronique. Cependant, ils reflètent un impact réel de la perte d'IL-17RD dans les **deux compartiments** démontrant, (i) un effet anti-tumoral dans les cellules épithéliales et (ii) un effet anti-tumoral lorsque déplété dans les cellules immunitaires. Des études plus approfondies seront nécessaires pour comprendre les mécanismes fins associés à la perte d'IL-17RD dans ce contexte spécifique.

Idéalement, certains modèles plus appropriés devraient être utilisés pour répondre clairement à l'implication d'IL-17RD dans les deux compartiments dans le modèle AOM-DSS tels que, (i) des souris **conditionnelles** pour les cellules épithéliales colorectales (IECs) ou les cellules hématopoïétiques et, (ii) des souris **chimères de la moelle osseuse**.

5.4.2 Implication de cellules productrices d'IL-17A et F

Plusieurs évidences suggèrent une augmentation de **cellules productrices d'IL-17A et F** dans le modèle AOM-DSS suite à la perte d'IL-17RD. En effet, les analyses IPA des données de RNAseq ont identifié des GO TERMS impliqués dans (i) des maladies et fonctions de l'IL-17A et F, (ii) la différenciation de certaines cellules T auxiliaires, Th1, Th2 et les cellules productrices d'IL-17, les Th17, et (iii) la signalisation en aval de l'IL-

17A (**Figure 5A**). Par ailleurs, parmi tous les ligands de la famille de l'IL-17, nos données montrent une augmentation des ligands IL-17A et F exclusivement (**Figure 5B**). Cependant, des analyses sanguines n'ont montré aucune augmentation de marqueurs de différenciation ou production de cellules Th17 dans le sérum de souris *Il17rd^{-/-}* (**Figure 5C**).

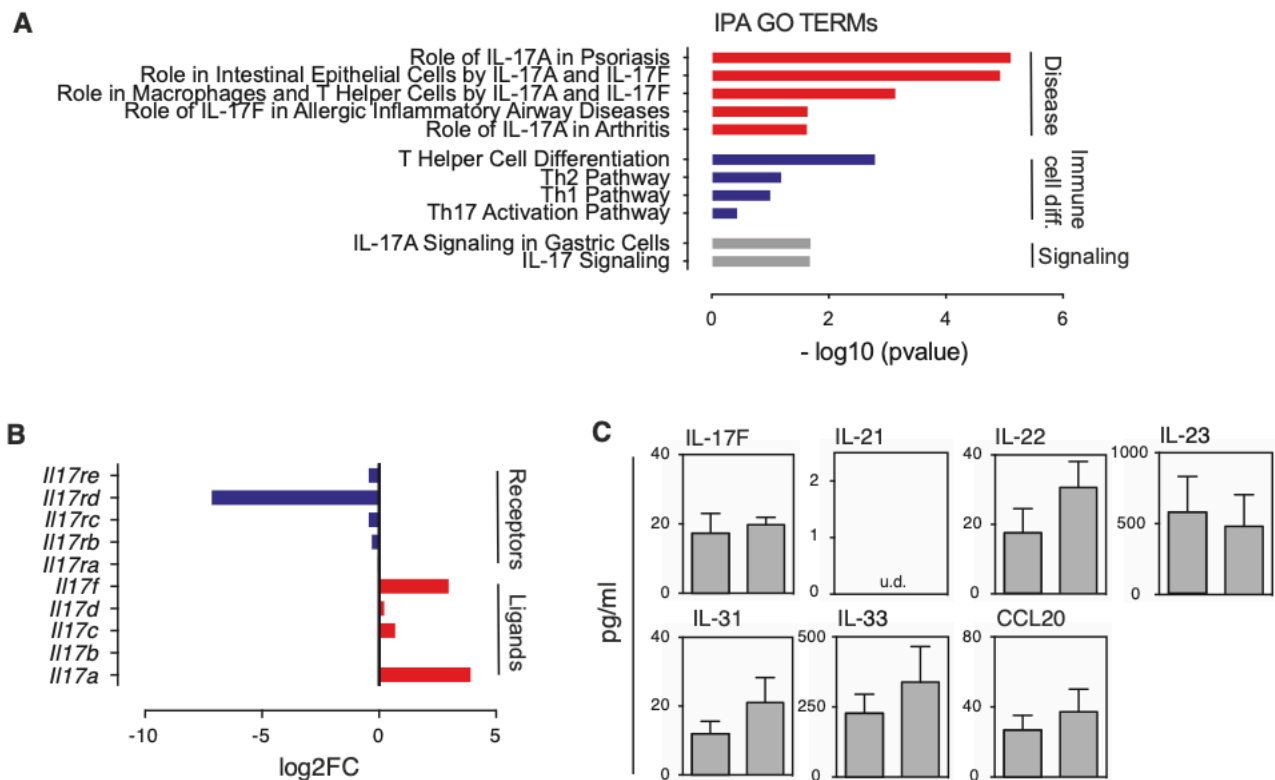


Figure 5. – IL-17A et F sont augmentés dans les tumeurs *Il17rd^{-/-}*. (A) Analyse IPA des GO TERMS. (B) Expression relative de l'ARNm des membres de la famille des récepteurs à l'IL-17 dans les tumeurs *Il17rd^{-/-}* par rapport aux WT. Données issues des analyses transcriptomiques. (C) Niveaux protéiques de cytokines dans le sérum de souris WT et *Il17rd^{-/-}*.

De manière intéressante, plusieurs autres populations de cellules de l'immunité innée peuvent être une **source précoce d'IL-17** en réponse au stress, aux lésions ou aux pathogènes. Ces sources précoces jouent un rôle central dans l'initiation de la

réponse immunitaire dépendante d'IL-17⁶⁵. Il a été démontré que la production d'IL-17A dans les 4 à 8 heures après une infection microbienne augmente le recrutement de neutrophiles résultant de la production d'IL-6, G-CSF et CXCL8 pour induire une réponse immunitaire non spécifique, rapide⁶⁶. Ainsi les systèmes qui protègent les organes de l'environnement, notamment la muqueuse intestinale, contiennent des **cellules sentinelles** capables de produire l'IL-17A^{67,68}. Celles-ci comprennent les cellules T $\gamma\delta$, les cellules tueuses (NK), les NK invariants, les cellules de type inductrices de tissus lymphoïdes (LTi), et les myéloïdes⁶⁹⁻⁷². De plus, certaines cellules épithéliales telles que les **cellules de Paneth** sont hautement spécialisées et impliquées dans l'homéostasie et l'immunité des muqueuses^{73,74} et produisent l'IL-17⁷⁵. Cette production précoce d'IL-17 par ces sous populations de cellules (p. ex., les cellules T $\gamma\delta$) est impliquée dans l'**amorçage** et le **prolongement de l'auto-immunité**⁷⁶⁻⁷⁹ et pourrait donc être à l'origine de l'inflammation accrue observée dans notre modèle. Par ailleurs, IL-17A a aussi été démontré comme un inducteur de la tumorigénèse colorectale⁸⁰ et d'autres mécanismes tels que des dommages à la barrière et les produits microbiens peuvent entraîner une croissance tumorale induite par IL-23/IL-17⁸¹.

Afin de vérifier le réel potentiel de la production d'IL-17A engendrée par la perte d'IL-17RD dans la tumorigénèse associée à la colite, il serait intéressant d'utiliser le modèle AOM-DSS avec traitement aux **anticorps anti-IL-17**. En effet, le blocage d'IL-17A abolit le développement de certains modèles de colites⁸² et l'inflammation intestinale induite par les microbes commensaux⁸³, ainsi que certaines formes de cancers, telles que les cancers métastatiques du sein⁸⁴ ou les mélanomes⁸⁵.

5.4.3 Un intérêt grandissant pour IL-17 et IL-17RD

Depuis la caractérisation des cellules Th17 productrices de l'IL17A et F en 2005⁸⁶⁻⁸⁹ et la découverte de l'implication d'IL-17A dans de multiples processus essentiels à la défense de la cellule contre de potentiels pathogènes⁹⁰, l'intérêt pour cette cytokine a grandement augmenté (**Figure 6A**). Par conséquent, de par son implication dans la

signalisation IL-17 et dans l'inflammation, IL-17RD fait aussi l'objet d'un nombre encore faible mais grandissant d'études, qui a notamment doublé en 2019 (**Figure 6B**).

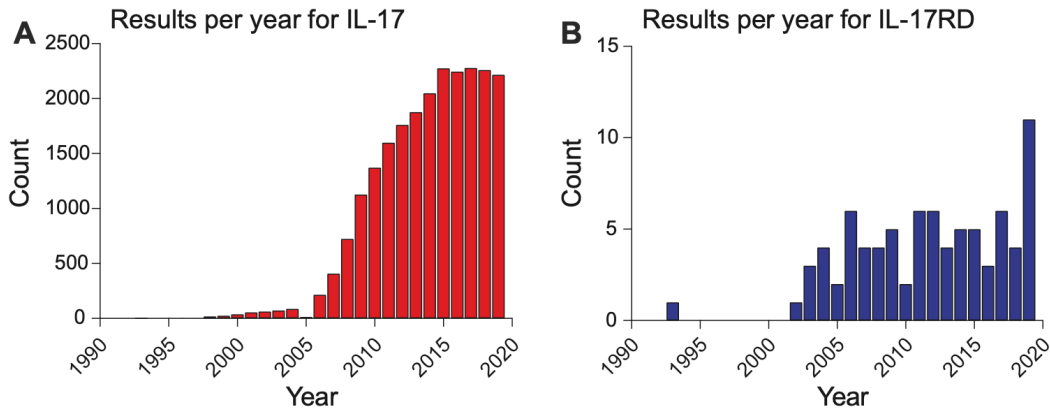


Figure 6. – Résultats issus de PUBMED par an pour IL-17 et IL-17RD de 1990 à 2019. (A) Représentation du compte de publications sur IL-17. (B) Représentation du compte de publications sur IL-17RD.

La recherche sur la protéine IL-17RD reste très pauvre et s'explique probablement par les défis techniques que son étude représente. En effet, IL-17RD est difficilement détectable de manière endogène par immunobuvardage. Très peu d'**anticorps efficaces** sont disponibles et il semblerait que son **expression endogène** est souvent trop faible pour être détectée.

Il existe beaucoup d'études controversées sur le rôle d'IL-17RD dans la carcinogénèse et l'inflammation qui nécessiteraient un peu plus d'attention et la caractérisation complète de la lignée *Il17rd^{-/-}* dans différentes conditions pourraient permettre d'élargir nos connaissances sur son rôle. Ainsi, les évidences de Mark Mellett et ses collègues ainsi que nos études *in vivo* ont aussi permis d'identifier de nouveaux rôles fonctionnels dans la réponse antivirale et le métabolisme, respectivement.

5.5 Au-delà de sa fonction dans la carcinogénèse

5.5.1 Une nouvelle fonction d'IL-17RD dans le métabolisme lipidique

De manière intéressante, les données de RNAseq sur les tumeurs AOM-DSS ont mis en évidence plusieurs signatures liées au métabolisme lipidique. Le métabolisme étant un facteur important dans la carcinogénèse^{91,92}, cette piste nous a paru intéressante et nous avons poursuivi l'hypothèse d'un rôle d'IL-17RD dans le métabolisme lipidique avec quelques expériences préliminaires décrites en **Annexe II**.

5.5.2 Un nouveau rôle d'IL-17RD dans l'immunité innée antivirale

De manière générale, l'investigation du rôle d'IL-17RD dans la réponse immunitaire innée antivirale nous a permis (i) d'identifier la voie de reconnaissance des **ARNs viraux cytoplasmiques** comme une voie de signalisation régulée par IL-17RD, (ii) d'identifier un potentiel **nouvel interacteur** d'IL-17RD. De plus, notre étude a permis de montrer que la voie cGAS/STING n'est pas ou peu affectée par IL-17RD. Premièrement, il a été démontré qu'IL-17RD inhibe la signalisation induite par RIG-I alors que la régulation de la signalisation induite par MDA5 n'a pas été abordée. Deuxièmement, une forme de RIG-I semble interagir avec IL-17RD. Il est suggéré que la forme ubiquitinée de RIG-I interagisse préférentiellement avec IL-17RD. Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur de RIG-I et de l'ubiquitination est nécessaire pour confirmer ces résultats. Ainsi, notre étude établit un potentiel nouveau rôle d'IL-17RD dans la régulation de voies de signalisation antivirales cytoplasmiques. De nombreuses expériences complémentaires sont nécessaires pour délimiter l'impact d'IL-17RD dans la réponse antivirale liée aux récepteurs cytoplasmiques RIG-I, MDA5 et cGAS/STING et en déterminer les mécanismes fins.

De manière intéressante, la caractérisation de la lignée *Il17rd^{-/-}* à 12 semaines, nous a permis de mettre en évidence un phénotype apparenté à de l'**hyposplénisme**. En effet, les rates *Il17rd^{-/-}* sont significativement plus petites que les WT (**Figure 7A**). La rate est composée de cellules lymphoïdes et myéloïdes provenant de la moelle osseuse

et du thymus. Néanmoins, aucune différence de morphologie et physiologie du thymus n'a été observé (**Figure 7B**).

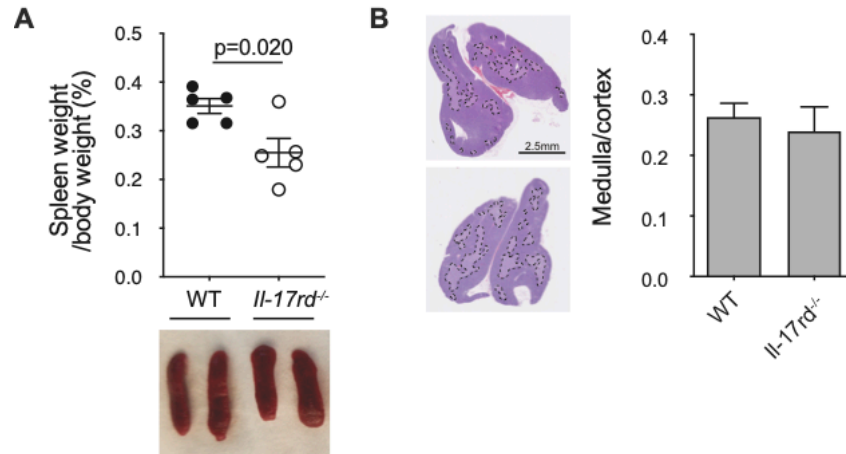


Figure 7. – *Il17rd^{-/-}* mice exhibit smaller spleens than WT mice without any impact on the thymus. (A) Top, Spleen weight of 12 weeks old mice was measured. Bottom, photographic representation of WT and *Il17rd^{-/-}* spleens. (B) Left panel, H&E representation of WT and *Il17rd^{-/-}* thymus. Right panel, quantification of relative medulla to cortex area.

La rate a plusieurs fonctions telles que la **suppression d'érythrocytes anormaux** et des **plaquettes** du sang. C'est aussi un **réservoir** pour les érythrocytes, plaquettes et le fer et une source de lymphocytes et cellules hématopoïétiques. En tant qu'organe secondaire dans le système immunitaire, la rate est particulièrement importante pendant la **septicémie**. Les antigènes circulants sont piégés dans la zone marginale où ils entrent en contact avec les cellules immunoréactives. Or il a été rapporté que les souris *Il17rd^{-/-}* étaient plus sensibles au choc septique que les WT⁸.

Afin d'investiguer l'impact de la perte d'IL-17RD sur la rate, nous avons analysé le transcriptome de rates de souris WT et *Il17rd^{-/-}* par séquençage d'ARN. Nous avons identifié seulement 19 gènes exprimés de manière différentielle ($p \text{ adj} < 0.05$; $\text{Log}_2\text{Foldchange} > 1$). Par ailleurs, des analyses d'enrichissement GO ont identifié 16 signatures significatives ($p < 0.05$) associées aux processus biologiques. Plusieurs

signatures de **réponse aux virus** figurent dans les plus significatives, suivis de près par des signatures liées à la **réponse au LPS** (Figure 7, panneau du haut). Des analyses bio-informatiques additionnelles par analyse KEGG confirment l'implication d'une **réponse accrue aux virus** et d'une **reconnaissance accrue de l'ADN et ARN cytosolique**. De manière intéressante, on observe une signature significative pour les IBDs (Figure 7, panneau du bas).

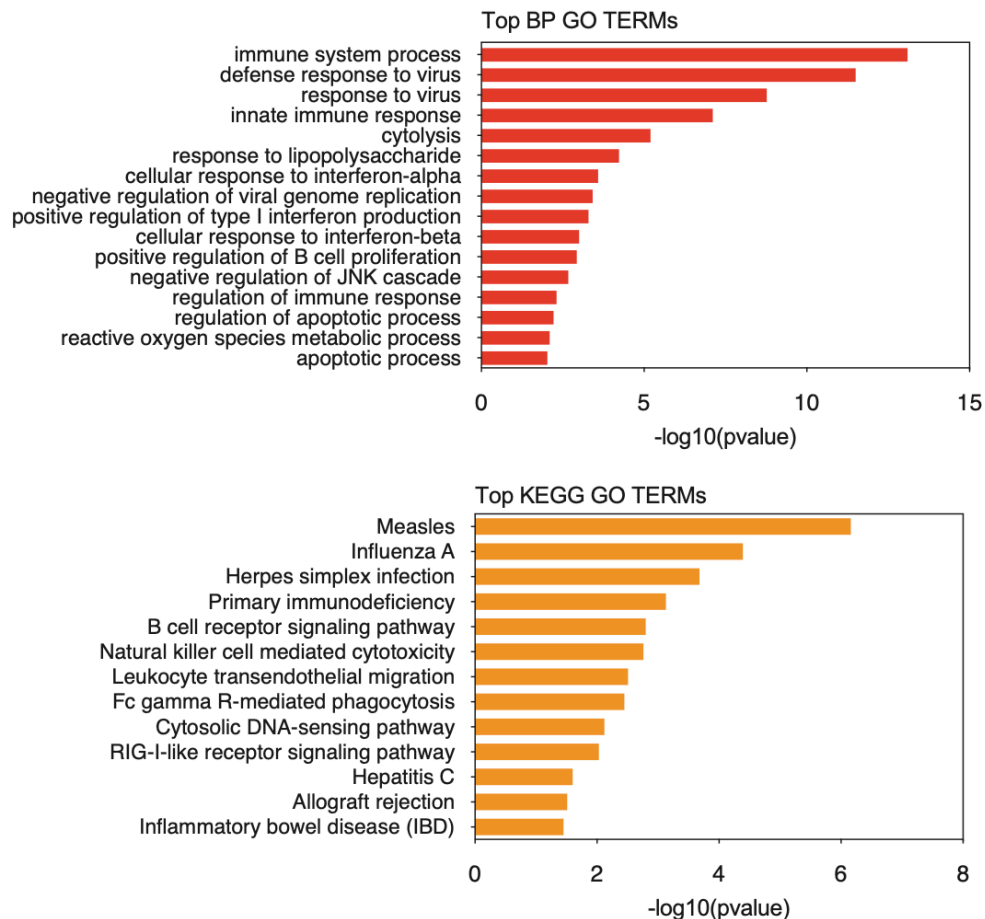


Figure 8. – Loss of IL-17RD induce innate immunity-linked gene signatures in the spleen. GO enrichment analysis of differentially expressed genes showing biological processes (BP) (top panel) and KEGG signatures (bottom panel) enriched in Il17rd-/spleens ($p < 0.05$) ($n = 5$).

Ces résultats donnent des évidences supplémentaires d'un rôle d'IL-17RD dans la réponse antivirale.

5.6 Conclusion et perspectives

Depuis la découverte de la famille des récepteurs à l'IL-17 dont fait partie IL-17RD, des études sur les différents membres ont été entreprises. IL-17RD reste à ce jour le membre le moins étudié.

Tout au long de cette thèse nous avons utilisé plusieurs modèles murins et autres approches *in vitro* afin d'apporter de nouvelles connaissances sur le rôle d'IL-17RD dans la carcinogénèse et l'immunité innée.

Dans nos deux modèles de vieillissement et de carcinogénèse colorectale associée à la colite, nous avons trouvé qu'IL-17RD , (i) agit comme gène suppresseur de tumeur haplo-insuffisant *in vivo*, (ii) inhibe la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, (iii) n'a pas d'impact majeur sur les voies mitogéniques. De manière intéressante, nous avons observé que le rôle d'IL-17RD dans la carcinogénèse est dépendant du sexe. Finalement, le modèle AOM-DSS nous a permis de déterminer pour la première fois que l'inflammation exacerbée engendrée par la perte d'IL-17RD pouvait être à l'origine d'une tumorigénèse accrue. De plus, nous suggérons qu'IL-17RD a un impact sur les cellules non hématopoïétiques et hématopoïétiques à différents niveaux pour induire la tumorigénèse associée à la colite et que les cytokines IL-17A et F jouent un potentiel rôle dans cette induction.

Par ailleurs, dans des lignées cellulaires *in vitro*, nous avons démontré qu'IL-17RD est capable de (i) inhiber la réponse immunitaire innée antivirale, (ii) inhiber la voie de signalisation antivirale RIG-I spécifiquement, (iii) interagir avec le récepteur RIG-I directement. Cependant, de nombreuses expériences sont nécessaires pour comprendre les mécanismes fins de cette régulation.

En général, nos études démontrent pour la première fois qu'IL-17RD est un véritable suppresseur de tumeur *in vivo* et qu'il agit principalement par la régulation de la

réponse immunitaire innée pour remplir cette fonction. De plus, elles permettent d'élargir le rôle d'IL-17RD dans l'inflammation à la réponse immunitaire innée aux ARN viraux.

5.7 Références

1. Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, et al. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol.* 2007;178(10):6444-6455.
2. Stryke D, Kawamoto M, Huang CC, et al. BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(1):278-281.
3. Leighton PA, Mitchell KJ, Goodrich LV, et al. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature.* 2001;410(6825):174-179.
4. Lin W, Jing N, Basson MA, Dierich A, Licht J, Ang SL. Synergistic activity of Sef and Sprouty proteins in regulating the expression of Gbx2 in the mid-hindbrain region. *Genesis.* 2005;41(3):110-115.
5. Abraira VE, Hyun N, Tucker AF, et al. Changes in Sef levels influence auditory brainstem development and function. *J Neurosci.* 2007;27(16):4273-4282.
6. He Q, Yang X, Gong Y, et al. Deficiency of Sef is associated with increased postnatal cortical bone mass by regulating Runx2 activity. *J Bone Miner Res.* 2014;29(5):1217-1231.
7. Mellett M, Atzei P, Horgan A, et al. Orphan receptor IL-17RD tunes IL-17A signalling and is required for neutrophilia. *Nat Commun.* 2012;3:1119.
8. Mellett M, Atzei P, Bergin R, et al. Orphan receptor IL-17RD regulates Toll-like receptor signalling via SEFIR/TIR interactions. *Nat Commun.* 2015;6:6669.
9. Su Y, Huang J, Zhao X, et al. Interleukin-17 receptor D constitutes an alternative receptor for interleukin-17A important in psoriasis-like skin inflammation. *Sci Immunol.* 2019;4(36).
10. Billi AC, Gudjonsson JE. Interleukin-17 receptor D: An orphan receptor finds a home in the skin. *Sci Immunol.* 2019;4(36).
11. Wang M, Zhao J, Zhang L, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer.* 2017;8(5):761-773.
12. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 23):5591-5596.

13. Lim B, Woodward WA, Wang X, Reuben JM, Ueno NT. Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):485-499.
14. Dix D, Cohen P. On the role of aging in carcinogenesis. *Anticancer Res*. 1999;19(1b):723-726.
15. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*. 2001;37 Suppl 8:S4-66.
16. Montesano R, Hall J. Environmental causes of human cancers. *Eur J Cancer*. 2001;37 Suppl 8:S67-87.
17. Kaku K, Fiedorek FT, Jr., Province M, Permutt MA. Genetic analysis of glucose tolerance in inbred mouse strains. Evidence for polygenic control. *Diabetes*. 1988;37(6):707-713.
18. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 1988;37(9):1163-1167.
19. Surwit RS, Seldin MF, Kuhn CM, Cochrane C, Feinglos MN. Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice. *Diabetes*. 1991;40(1):82-87.
20. Freeman HC, Hugill A, Dear NT, Ashcroft FM, Cox RD. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 2006;55(7):2153-2156.
21. Ulland TK, Jain N, Hornick EE, et al. Nlrp12 mutation causes C57BL/6J strain-specific defect in neutrophil recruitment. *Nat Commun*. 2016;7:13180.
22. Shoji H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Mol Brain*. 2016;9:11.
23. Bouchlaka MN, Sckisel GD, Chen M, et al. Aging predisposes to acute inflammatory induced pathology after tumor immunotherapy. *J Exp Med*. 2013;210(11):2223-2237.
24. Kugel CH, 3rd, Douglass SM, Webster MR, et al. Age Correlates with Response to Anti-PD1, Reflecting Age-Related Differences in Intratumoral Effector and Regulatory T-Cell Populations. *Clin Cancer Res*. 2018;24(21):5347-5356.

25. Anisimov VN. The relationship between aging and carcinogenesis: a critical appraisal. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;45(3):277-304.
26. Duhamel S, Hebert J, Gaboury L, et al. Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation. *Cancer Res*. 2012;72(3):626-635.
27. Voisin L, Julien C, Duhamel S, et al. Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer*. 2008;8:337.
28. Pekow J, Meckel K, Dougherty U, et al. miR-193a-3p is a Key Tumor Suppressor in Ulcerative Colitis-Associated Colon Cancer and Promotes Carcinogenesis through Upregulation of IL17RD. *Clin Cancer Res*. 2017;23(17):5281-5291.
29. Parang B, Barrett CW, Williams CS. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol*. 2016;1422:297-307.
30. Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis*. 2000;21(4):757-768.
31. Furthauer M, Lin W, Ang SL, Thisse B, Thisse C. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol*. 2002;4(2):170-174.
32. Xiong S, Zhao Q, Rong Z, et al. hSef inhibits PC-12 cell differentiation by interfering with Ras-mitogen-activated protein kinase MAPK signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(50):50273-50282.
33. Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell*. 2004;7(1):33-44.
34. Yang X, Kovalenko D, Nadeau RJ, et al. Sef interacts with TAK1 and mediates JNK activation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2004;279(37):38099-38102.
35. Darby S, Sahadevan K, Khan MM, Robson CN, Leung HY, Gnanapragasam VJ. Loss of Sef (similar expression to FGF) expression is associated with high grade and metastatic prostate cancer. *Oncogene*. 2006;25(29):4122-4127.

36. Zisman-Rozen S, Fink D, Ben-Izhak O, et al. Downregulation of Sef, an inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling, is common to a variety of human carcinomas. *Oncogene*. 2007;26(41):6093-6098.
37. Darby S, Murphy T, Thomas H, et al. Similar expression to FGF (Sef) inhibits fibroblast growth factor-induced tumorigenic behaviour in prostate cancer cells and is downregulated in aggressive clinical disease. *Br J Cancer*. 2009;101(11):1891-1899.
38. Guo Q, Zhang H, Zhao X, Fu Y, Zhang J, Li M. Loss of expressions of Dusp6, Sprouty4, and Sef, negative regulators of FGF2/ERK1/2 signaling, in the endometrium of women with adenomyosis. *Int J Gynecol Pathol*. 2014;33(3):288-297.
39. Ziv I, Fuchs Y, Preger E, et al. The human sef-a isoform utilizes different mechanisms to regulate receptor tyrosine kinase signaling pathways and subsequent cell fate. *J Biol Chem*. 2006;281(51):39225-39235.
40. Rong Z, Ren Y, Cheng L, et al. Sef-S, an alternative splice isoform of sef gene, inhibits NIH3T3 cell proliferation via a mitogen-activated protein kinases p42 and p44 (ERK1/2)-independent mechanism. *Cell Signal*. 2007;19(1):93-102.
41. Zhang H, Zhao X, Yan L, Li M. Similar expression to FGF (Sef) reduces endometrial adenocarcinoma cells proliferation via inhibiting fibroblast growth factor 2-mediated MAPK/ERK signaling pathway. *Gynecol Oncol*. 2011;122(3):669-674.
42. Sun X, Wang Y, Yang S, Ren F, Xia Y, Chang Z. Activation of TAK1 by Sef-S induces apoptosis in 293T cells. *Cell Signal*. 2013;25(10):2039-2046.
43. He Q, Gong Y, Gower L, Yang X, Friesel RE. Sef Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *J Cell Biochem*. 2016;117(10):2346-2356.
44. Hori S, Wadhwa K, Pisupati V, et al. Loss of hSef promotes metastasis through upregulation of EMT in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2017;140(8):1881-1887.

45. Peng DH, Kundu ST, Fradette JJ, et al. ZEB1 suppression sensitizes KRAS mutant cancers to MEK inhibition by an IL17RD-dependent mechanism. *Sci Transl Med.* 2019;11(483).
46. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1971;68(4):820-823.
47. Santarosa M, Ashworth A. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1654(2):105-122.
48. Inoue K, Fry EA. Haploinsufficient tumor suppressor genes. *Adv Med Biol.* 2017;118:83-122.
49. Meissl K, Macho-Maschler S, Müller M, Strobl B. The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. *Cytokine.* 2017;89:12-20.
50. Chan SR, Vermi W, Luo J, et al. STAT1-deficient mice spontaneously develop estrogen receptor α -positive luminal mammary carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2012;14(1):R16.
51. Schneckenleithner C, Bago-Horvath Z, Dolznig H, et al. Putting the brakes on mammary tumorigenesis: loss of STAT1 predisposes to intraepithelial neoplasias. *Oncotarget.* 2011;2(12):1043-1054.
52. Crnčec I, Modak M, Gordziel C, et al. STAT1 is a sex-specific tumor suppressor in colitis-associated colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2018;12(4):514-528.
53. Clocchiatti A, Cora E, Zhang Y, Dotto GP. Sexual dimorphism in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(5):330-339.
54. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):626-638.
55. Luo Y, Wu J, Wu Q, et al. miR-577 Regulates TGF- β Induced Cancer Progression through a SDPR-Modulated Positive-Feedback Loop with ERK-NF- κ B in Gastric Cancer. *Mol Ther.* 2019;27(6):1166-1182.
56. Pan X, Feng J, Zhu Z, et al. A positive feedback loop between miR-181b and STAT3 that affects Warburg effect in colon cancer via regulating PIAS3 expression. *J Cell Mol Med.* 2018;22(10):5040-5049.

57. Kim HB, Kim M, Park YS, et al. Prostaglandin E(2) Activates YAP and a Positive-Signaling Loop to Promote Colon Regeneration After Colitis but Also Carcinogenesis in Mice. *Gastroenterology*. 2017;152(3):616-630.
58. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(6):320-328.
59. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell*. 2004;7(4):491-501.
60. Ren J, Sui H, Fang F, Li Q, Li B. The application of Apc(Min/+) mouse model in colorectal tumor researches. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(5):1111-1122.
61. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69 Suppl 1:S4-9.
62. Taniguchi K, Karin M. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(5):309-324.
63. Furman D, Campisi J, Verdin E, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med*. 2019;25(12):1822-1832.
64. Liu XL, Ding J, Meng LH. Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(10):1553-1558.
65. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):479-489.
66. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med*. 2005;202(6):761-769.
67. Lochner M, Peduto L, Cherrier M, et al. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med*. 2008;205(6):1381-1393.
68. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, et al. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity*. 2006;25(2):309-318.
69. Cella M, Fuchs A, Vermi W, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*. 2009;457(7230):722-725.

70. Takatori H, Kanno Y, Watford WT, et al. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med.* 2009;206(1):35-41.
71. Michel ML, Keller AC, Paget C, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med.* 2007;204(5):995-1001.
72. Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, Hunter CA. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol.* 2010;184(4):1776-1783.
73. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol.* 2000;1(2):113-118.
74. Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, et al. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science.* 1999;286(5437):113-117.
75. Takahashi N, Vanlaere I, de Rycke R, et al. IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock. *J Exp Med.* 2008;205(8):1755-1761.
76. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* 2009;31(2):331-341.
77. Roark CL, French JD, Taylor MA, Bendele AM, Born WK, O'Brien RL. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J Immunol.* 2007;179(8):5576-5583.
78. Ito Y, Usui T, Kobayashi S, et al. Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(8):2294-2303.
79. Cui Y, Shao H, Lan C, et al. Major role of gamma delta T cells in the generation of IL-17+ uveitogenic T cells. *J Immunol.* 2009;183(1):560-567.
80. Wang K, Kim MK, Di Caro G, et al. Interleukin-17 receptor signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity.* 2014;41(6):1052-1063.

81. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254-258.
82. Ermann J, Staton T, Glickman JN, de Waal Malefyt R, Glimcher LH. Nod/Ripk2 signaling in dendritic cells activates IL-17A-secreting innate lymphoid cells and drives colitis in T-bet^{-/-}.Rag2^{-/-} (TRUC) mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2014;111(25):E2559-2566.
83. Xin L, Jiang TT, Chaturvedi V, et al. Commensal microbes drive intestinal inflammation by IL-17-producing CD4⁺ T cells through ICOSL and OX40L costimulation in the absence of B7-1 and B7-2. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2014;111(29):10672-10677.
84. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015;522(7556):345-348.
85. Uddin MN, Zhang Y, Harton JA, MacNamara KC, Avram D. TNF- α -dependent hematopoiesis following Bcl11b deletion in T cells restricts metastatic melanoma. *J Immunol*. 2014;192(4):1946-1953.
86. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(2):233-240.
87. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123-1132.
88. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1133-1141.
89. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-189.
90. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*. 2019;50(4):892-906.

91. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv.* 2016;2(5):e1600200.
92. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 2012;26(9):877-890.

Annexe I

1 Deregulated ERK1/2 MAP kinase signaling promotes aneuploidy by a Fbxw7 β -Aurora A pathway

Stéphanie Duhamel^{1,2,6}, Charlotte Girondel^{1,3}, Jonas F. Dorn^{1,7}, Pierre-Luc Tanguay¹, Laure Voisin¹, Ron Smits⁵, Paul S. Maddox^{1,4,8}, and Sylvain Meloche^{1,2,3}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, Quebec, Canada.

²Molecular Biology Program, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

³Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

⁴Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

⁵Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC, 3000 CA Rotterdam, The Netherlands

⁶Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

⁷Novartis AG, Basel, Switzerland

⁸Department of Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, NC 27599-3280, USA

Keywords: ERK1/2 MAP kinases, cytokinesis, aneuploidy, Aurora A, Fbxw7

Correspondence and requests for materials should be addressed to:

Dr Sylvain Meloche (email: sylvain.meloche@umontreal.ca)

1.1 Mise en contexte

Le laboratoire s'est longtemps attardé à déterminer l'implication de la voie Ras-MEK1/2-ERK1/2 dans l'initiation et la progression du cancer colorectal. Ainsi, Stéphanie Duhamel, ancienne étudiante au doctorat a initié un projet visant à caractériser la tétraploïdie et l'instabilité chromosomique (CIN) observée suite à la suractivation de la voie Ras-ERK1/2. L'aneuploïdie et CIN sont observés dans la majorité des cancers colorectaux et sont associés à un mauvais pronostic. Nous montrons dans cette étude que l'hyperactivation de ERK1/2 par Ras oncogénique ou une forme constitutivement active de MEK induit des défauts mitotiques qui mènent à la tétraploïdie, l'aneuploïdie et CIN. Nous avons identifié une altération de l'expression et la localisation d'Aurora A résultant d'une perte d'expression de Fbxw7 β induite par la dérégulation de Ras-ERK1/2.

Lors de cette étude, j'ai eu l'occasion de participer aux révisions du manuscrit. Dans ce contexte, mes travaux ont consisté à préciser le mécanisme de régulation de Fbxw7 β en vérifiant la stabilité de l'ARNm. De plus, des expériences et analyses de séquençage au bisulfite ont permis de déterminer que la méthylation du promoteur de Fbxw7 β ne semblait pas être impliquée dans le processus de régulation de son expression (données finalement non montrées dans le manuscrit).

1.2 Contribution des auteurs

Stéphanie Duhamel a conceptualisé le projet, mis en place et exécuté la majorité des expériences, analysé les résultats et écrit la première version du manuscrit.

Charlotte Girondel a mis en place et contribué à l'exécution des expériences de la Figure 4 ainsi que des expériences de méthylation de promoteur, non présentes ici.

Jonas F. Dorn a contribué à l'analyse des expériences de cycle cellulaire en time-lapse

Pierre-Luc Tanguay a contribué à l'exécution de certaines expériences cellulaires

Laure Voisin a contribué à l'exécution de certaines expériences cellulaires

Ron Smits a fourni la lignée de souris Villin-rTA

Paul S. Maddox a contribué à l'analyse des expériences de cycle cellulaire en time-lapse

Sylvain Meloche a conceptualisé le projet, analysé les résultats et écrit la première version du manuscrit.

Tous les auteurs ont approuvé la dernière version du manuscrit.

1.3 Abstract

Aneuploidy is a common feature of human solid tumors and is often associated with poor prognosis. There is growing evidence that oncogenic signaling pathways, which are universally dysregulated in cancer, contribute to the promotion of aneuploidy. However, the mechanisms connecting signaling pathways to the execution of mitosis and cytokinesis are not well understood. Here, we show that hyperactivation of the ERK1/2 MAP kinase pathway in epithelial cells impairs cytokinesis, leading to polyploidization and aneuploidy. Mechanistically, deregulated ERK1/2 signaling specifically downregulates expression of the F-box protein Fbxw7 β , a substrate-binding subunit of the SCF^{Fbxw7} ubiquitin ligase, resulting in the accumulation of the mitotic kinase Aurora A. Reduction of Aurora A levels by RNA interference or pharmacological inhibition of MEK1/2 reverts the defect in cytokinesis and decreases the frequency of abnormal cell divisions induced by oncogenic H-Ras^{V12}. Reciprocally, overexpression of Aurora A or silencing of Fbxw7 β phenocopies the effect of H-Ras^{V12} on cell division. *In vivo*, conditional activation of MEK2 in the mouse intestine lowers Fbxw7 β expression, resulting in the accumulation of cells with enlarged nuclei. We propose that the ERK1/2/Fbxw7 β /Aurora A axis identified in this study contributes to genomic instability and tumor progression.

1.4 Introduction

Aneuploidy is a very common feature of cancer, being present in 90% of human solid tumors and consistently associated with a worse prognosis^{1, 2}. Despite its largely detrimental effect on cellular fitness, aneuploidy is strongly associated with cancer, possibly because of its ability to generate the phenotypic diversity necessary to adapt to the stringent selection conditions observed during *in vivo* tumor development^{1, 3, 4}. Aneuploidy also promotes additional genomic instability by itself leading to both numerical and structural chromosomal alterations⁵⁻⁷.

One proposed route to aneuploidy is through generation of an unstable tetraploid intermediate state^{8, 9}. These tetraploid cells arise mainly from three mechanisms: cell fusion, endoreduplication, and cytokinesis failure or premature exit from mitosis. Consistent with an initiator role of tetraploidy in aneuploidy and tumorigenesis, cells with high chromosome numbers are frequently observed in early-stage cancers and many tumor cells exhibit a bimodal distribution of chromosome numbers with a near-tetraploid peak⁸. Experimentally, tetraploid fibroblast or epithelial cells generate tumors in mice that grow much faster than their diploid counterparts¹⁰⁻¹². Tetraploidization may help tolerate the genetic imbalance resulting from chromosomal instability (CIN) and aneuploidy to promote transformation³.

The mechanisms that cause tetraploidy and aneuploidy are not clear but accumulating evidence points to a role of oncogenic signaling pathways¹³. Specifically, hyperactive Ras signaling has been implicated in the induction of CIN but the precise molecular mechanisms involved remain unknown^{13, 14}. We have recently reported that oncogenic Ras or sustained nuclear MEK/ERK1/2 signaling induces tetraploidization of epithelial cells¹⁰. Here, we investigated the molecular basis of this oncogenic response. We now show that hyperactivation of ERK1/2 MAP kinases (MAPKs) specifically downregulates the F-box protein isoform Fbxw7 β , resulting in the accumulation of Aurora A, cytokinesis failure and polyploidization. Transgenic expression of activated MEK2 in mouse intestinal epithelial cells similarly decreases Fbxw7 β levels, concomitantly to the

accumulation of cells with enlarged nuclei, indicative of polyploidy. Our results link the activation of a common oncogenic signaling pathway to the promotion of aneuploidy.

1.5 Results

1.5.1 Activated MEK1DD and H-RasV12 induce cytokinesis defects leading to polyploidization

To study the mechanisms underlying activated Ras or MEK-induced tetraploidization, we analyzed the cell cycle kinetics of asynchronously proliferating intestinal epithelial IEC-6 cells expressing H-Ras^{V12} or MEK1DD (Fig. 1A). FACS analysis of phospho-histone H3 staining revealed an increased proportion of IEC-6-H-Ras^{V12} and IEC-6-MEK1DD cells in late G2/M phase (Fig. 1B), consistent with impairment in mitotic progression or cytokinesis. To carefully analyze progression through mitosis, IEC-6 cell populations were transduced with GFP-histone H2B and imaged by time-lapse digital microscopy. Mitotic events were timed to score defects in chromosome movements, anaphase progression and cytokinesis. The duration of mitosis (nuclear envelope breakdown (NEBD) to complete ingression of the cytokinetic furrow) was unaffected by the expression of H-Ras^{V12} or MEK1DD (Fig. 1C and 1D). Yet, a significant fraction of IEC-6-H-Ras^{V12} and IEC-6-MEK1DD cells were binucleated (26.1% and 26.3% vs none detected in control cells), indicative of a failure in cytokinesis (Fig. S1). Cytokinetic furrow initiation and ingression occurred with normal kinetics, but we observed several regression/ingression cycles in H-Ras^{V12} and MEK1DD-expressing cells (Fig. S1A and S1B), suggesting that binucleation arises from a defect in abscission¹⁵. In support of this idea, these cells often exhibited long cytoplasmic bridges and cytokinesis lasted more than 8 times longer than in control cells (Fig. 1C, 1D, S1A and S1B).

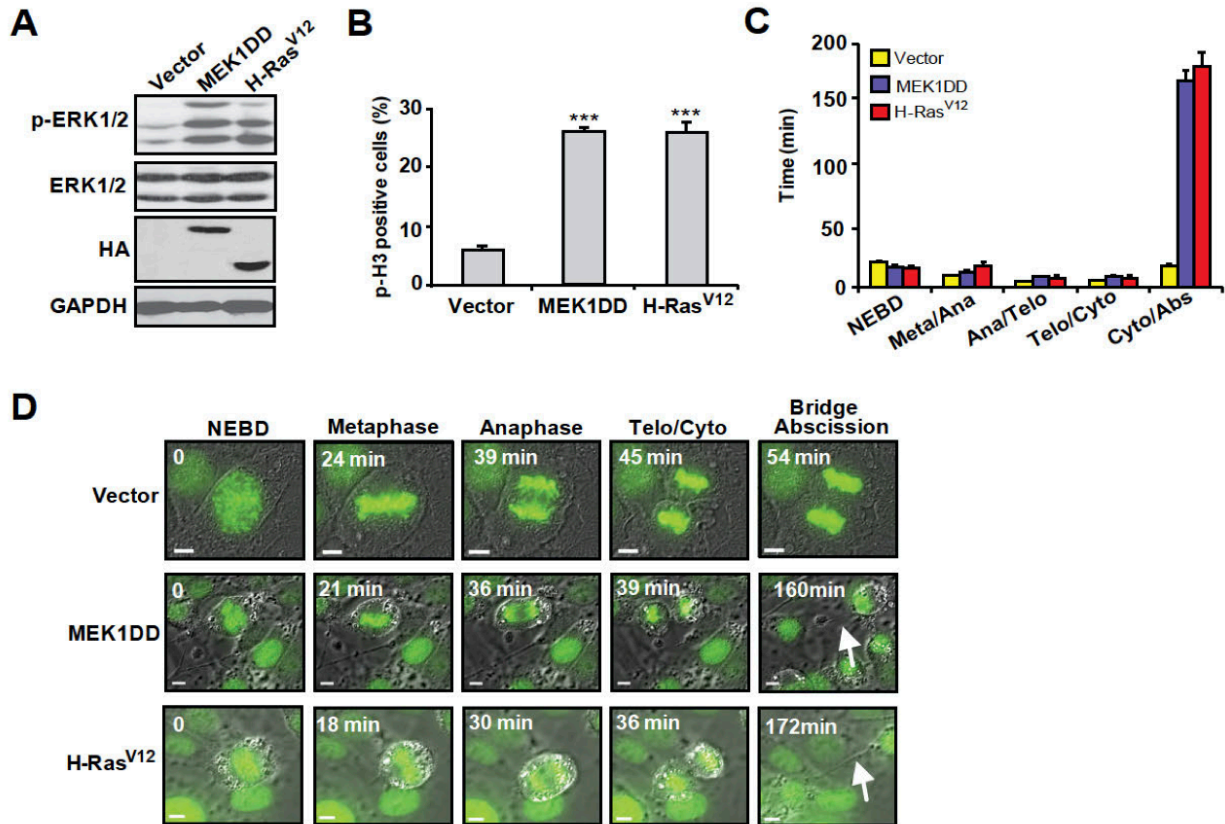


Figure 1. – Activated H-Ras^{V12} or MEK1DD induce cytokinesis defects. IEC-6 cells were infected with empty vector, MEK1DD or H-Ras^{V12} and analyzed 2 weeks post-infection. (A) Immunoblot analysis of proliferating IEC-6 cell populations (n=4). (B) Flow cytometry analysis of phospho-histone H3 (p-H3) expression. Results are expressed as mean \pm SEM (n=3). (C) Timing of mitotic progression revealed by time-lapse video imaging. Mean \pm SEM of 44 vector, 80 MEK1DD and 92 H-Ras^{V12}-expressing IEC-6 cells two weeks post-infection. (D) Time-lapse video imaging of representative mitotic progression of IEC-6 cell populations expressing GFP-tagged histone H2B. Scale bar, 5 μ m. Arrow, intercellular bridge. ***, $P < 0.005$.

1.5.2 Aurora A is a critical mediator of H-Ras^{V12}-induced cytokinesis failure

The mitotic kinase Aurora A is frequently overexpressed in human cancer, and its overexpression leads to cytokinesis failure, tetraploidization and genetic instability in cultured cells and mouse models^{16, 17}. We thus sought to evaluate the role of Aurora A in H-Ras^{V12}-induced cytokinesis failure. Expression of H-Ras^{V12} or MEK1DD in IEC-6 cells resulted in a marked up-regulation of Aurora A (Fig. 2A). Similarly to oncogenic Ras, overexpression of Aurora A was sufficient to cause cytokinesis failure and impair cell cycle progression of IEC-6 cells (Fig. 2B-F). Higher up-regulation of Aurora A levels also resulted in multipolar spindles (Fig. 2F).

To directly test the contribution of Aurora A to H-Ras^{V12}-induced cytokinesis failure, we down-regulated the expression of Aurora A to close-to-normal levels using lentivirus-transduced *Aurka* shRNAs (Fig. 2G). Complete depletion of Aurora A blocks mitotic entry and leads to multiple mitosis defects¹⁸ (unpublished observations). Reduction of Aurora A levels with two independent shRNAs reverted the defect in cytokinesis timing induced by H-Ras^{V12}, and markedly decreased the frequency of binucleated cells and cells exhibiting long cytoplasmic bridge, furrow regression and tripolar division (Fig. 2H and 2I). Overall, these results suggest that Aurora A is a key effector of oncogenic H-Ras^{V12}-mediated tetraploidization and aneuploidy.

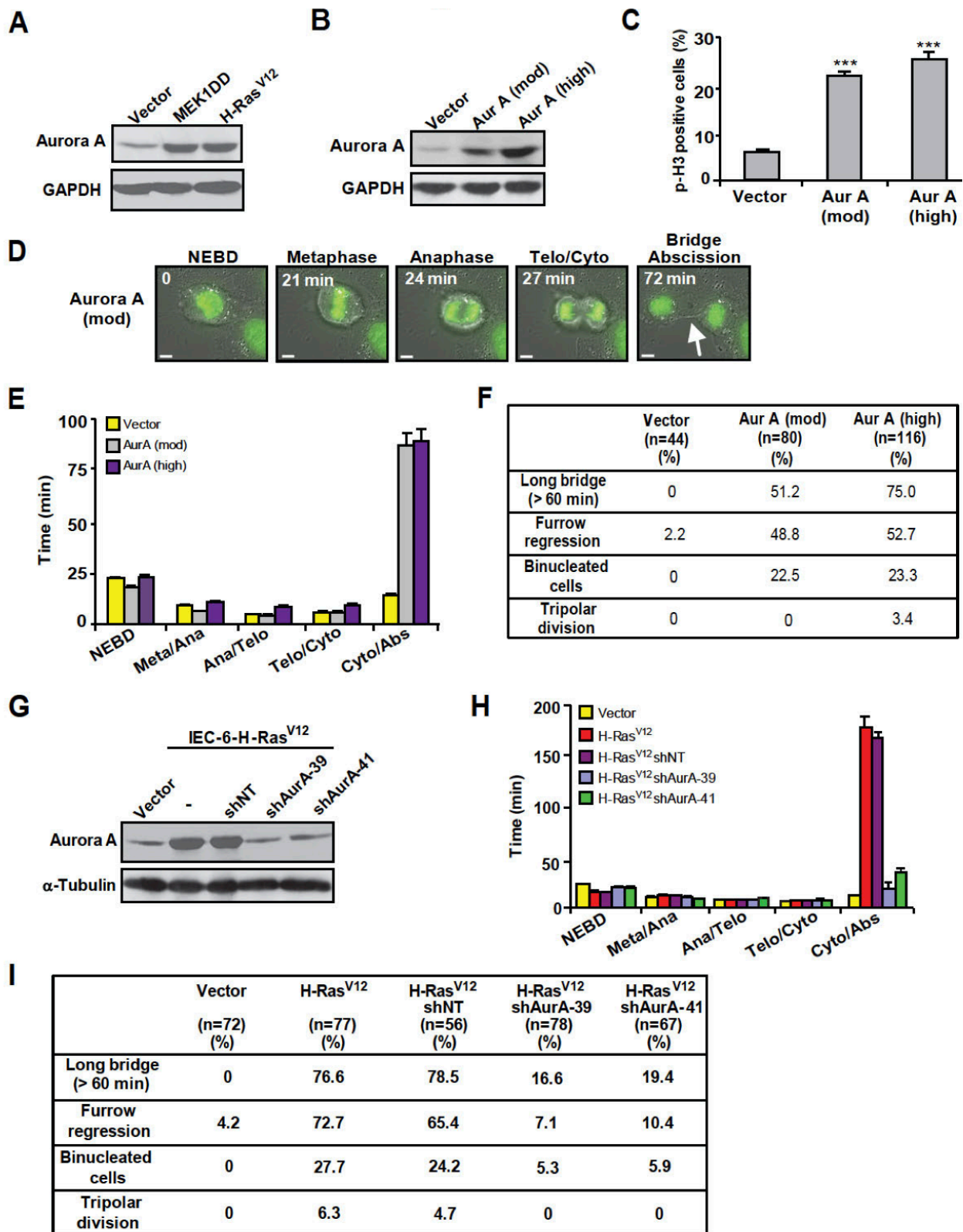


Figure 2. – Overexpression of Aurora A impairs cytokinesis and cell division. (A) Immunoblot analysis of Aurora A in proliferating IEC-6 cells infected with vector, MEK1DD

or H-Ras^{V12} (n=3). (B to F) IEC-6 cells were infected with empty vector or Aurora A-encoding retrovirus and cell populations expressing moderate or high levels of Aurora A were selected for functional analysis. (B) Immunoblot analysis of Aurora A expression (n=4). (C) Flow cytometry analysis of p-H3 expression. Results are expressed as mean \pm SEM (n=3). (D) Time-lapse video imaging of mitotic progression of IEC-6-H-Ras^{V12} cells transduced with GFP-histone H2B and moderately overexpressing Aurora A. Scale bar, 5 μ m. Arrow, intercellular bridge. (E) Timing of mitotic progression of control (Vector) IEC-6 cells (n=44) or IEC-6 cells expressing moderate (n=80) or high (n=116) levels of Aurora A at 2 weeks post-infection. (F) Quantification of cell division defects. (G to I) IEC-6-H-Ras^{V12} cells were infected or not with lentiviruses encoding non-target shRNA (shNT) or the indicated Aurora A shRNAs (shAurA). (G) Immunoblot analysis of Aurora A expression (n=3). (H) Time-lapse video imaging of mitotic progression of IEC-6-H-Ras^{V12} cells transduced with GFP-histone H2B and infected with Aurora A shRNA. (I) Quantification of cell division defects. ***, $P < 0.005$.

1.5.3 Oncogenic H-RasV12 induces polyploidization through ERK1/2 MAPK signaling

Expression of activated MEK1DD up-regulates Aurora A levels (Fig. 2A) and induces cytokinesis failure (Fig. 1B-D). To assess the specific contribution of the ERK1/2 MAPK signaling branch to H-Ras^{V12}-induced polyploidy, IEC-6-H-Ras^{V12} cells were treated with a low dose of the selective MEK1/2 inhibitor, PD184352. High doses of this compound induce G1 arrest. Treatment with 1 μ M PD184352, which restrains ERK1/2 hyperactivation, decreased the levels of Aurora A to levels seen in non-transformed cells (Fig. 3A). Importantly, PD184352 markedly reduced the length of cytokinesis and the frequency of abnormal cell divisions (furrow regression, binucleation, multipolar spindles) of H-Ras^{V12}-expressing cells (Fig. 3B and 3C). Consistent with these observations, long term treatment of IEC-6-H-Ras^{V12} cells with PD184352 significantly decreased the proportion of G2/M and polyploid/aneuploid cells (Fig. 3D-F). Thus, oncogenic H-Ras^{V12} induces cytokinesis defects, polyploidization and aneuploidy largely through ERK1/2 signaling.

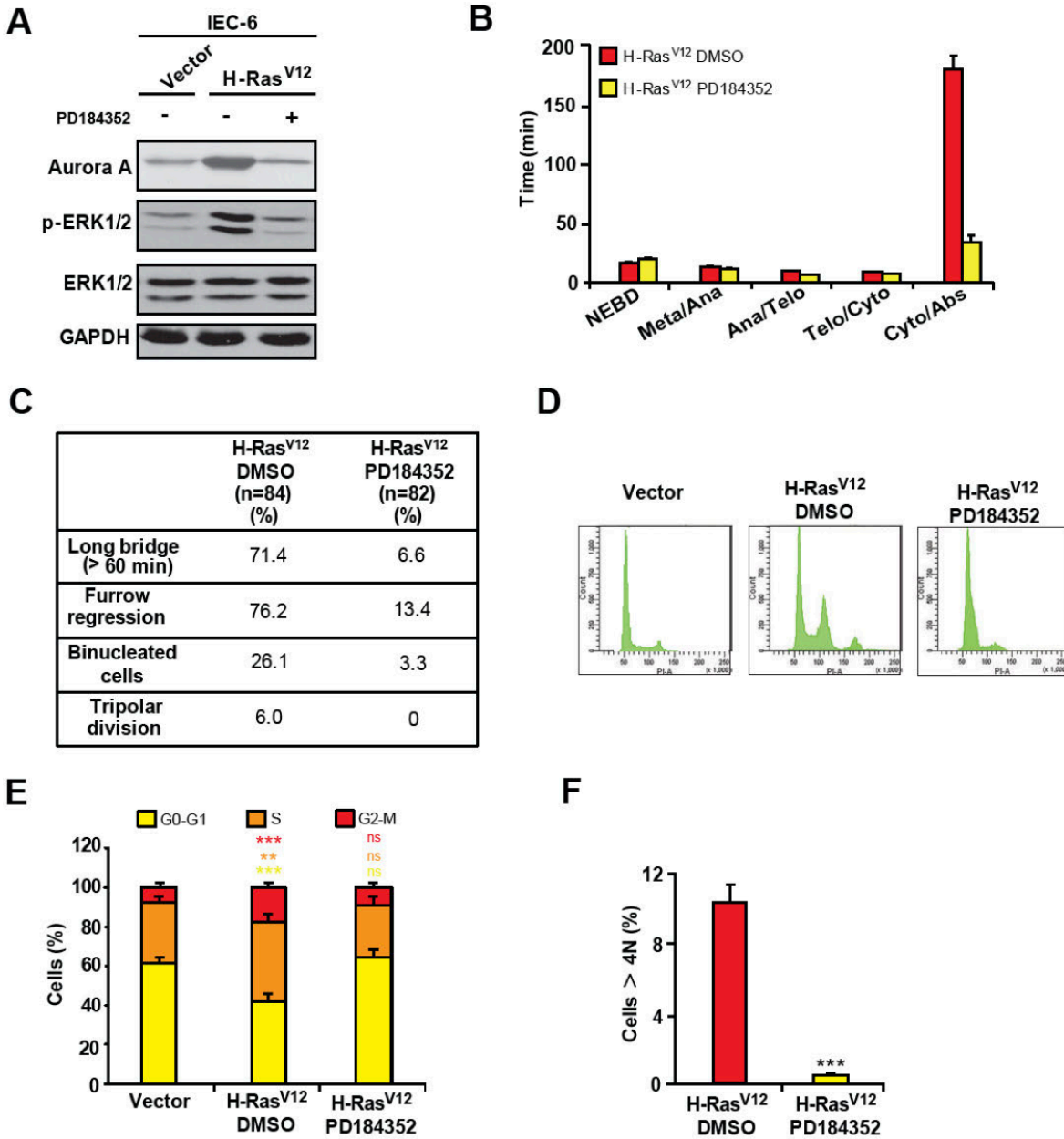


Figure 3. – H-Ras^{V12}-induced cytokinesis failure is mediated by the ERK1/2 pathway. (A) Immunoblot analysis of proliferating IEC-6-H-Ras^{V12} cells treated with vehicle or 1 μ M PD184352 (n=4). (B) Timing of mitotic progression of IEC-6-H-Ras^{V12} cells treated with vehicle (n=84) or PD184352 (n=82). Results are expressed as mean \pm SEM. (C) Quantification of cell division defects. (D) Representative cell cycle profiles of IEC-6-H-Ras^{V12} cells treated or not with PD184352 (n=3). (E) Proportion of cells in each cell cycle phase (n=3). (F) Proportion of cells with >4N DNA content 7 days after infection of IEC-6 cells with H-Ras^{V12} and treatment with vehicle or PD184352 (n=3). ns, non significant; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$.

1.5.4 Hyperactivation of the ERK1/2 pathway downregulates Fbxw7 β expression

We next investigated the molecular mechanism by which deregulated ERK1/2 signaling up-regulates Aurora A expression. The abundance of Aurora A is controlled at the level of transcription and protein turnover^{17, 19}. Specifically, Aurora A is targeted for degradation at mitotic exit by the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) and co-activator Cdh1²⁰⁻²². Expression of H-Ras^{V12} in *Cdh1*^{GT/GT} MEFs further up-regulated the levels of Aurora A (Fig. S2A) and significantly increased the frequency of polyploidy/aneuploid cells as compared to empty vector (Fig. S2B and S2C). These results argue that mechanisms other than Cdh1 inactivation contribute to Aurora A accumulation.

The SCF^{Fbxw7} ubiquitin ligase also promotes Aurora A ubiquitination and degradation²³⁻²⁵. We thus examined the effect of H-Ras^{V12} or MEK1DD on the expression of Fbxw7 isoforms in IEC-6 cells. No change in expression of Fbxw7 α was observed, but the levels of Fbxw7 β mRNA and protein were markedly downregulated in cells with activated Ras or MEK1 (Fig. 4A and 4B). **Actinomycin D-chase** experiments revealed no effect on Fbxw7 β mRNA stability, suggesting that regulation takes place predominantly at the transcriptional level (Fig. 4C). Treatment of IEC-6-H-Ras^{V12} cells with PD184352 rescued the expression of Fbxw7 β , concomitant to the reduction of Aurora A levels (Fig. 4D and 4E). These findings were generalized to human MCF10A mammary epithelial cells expressing H-Ras^{V12} (Fig. S3).

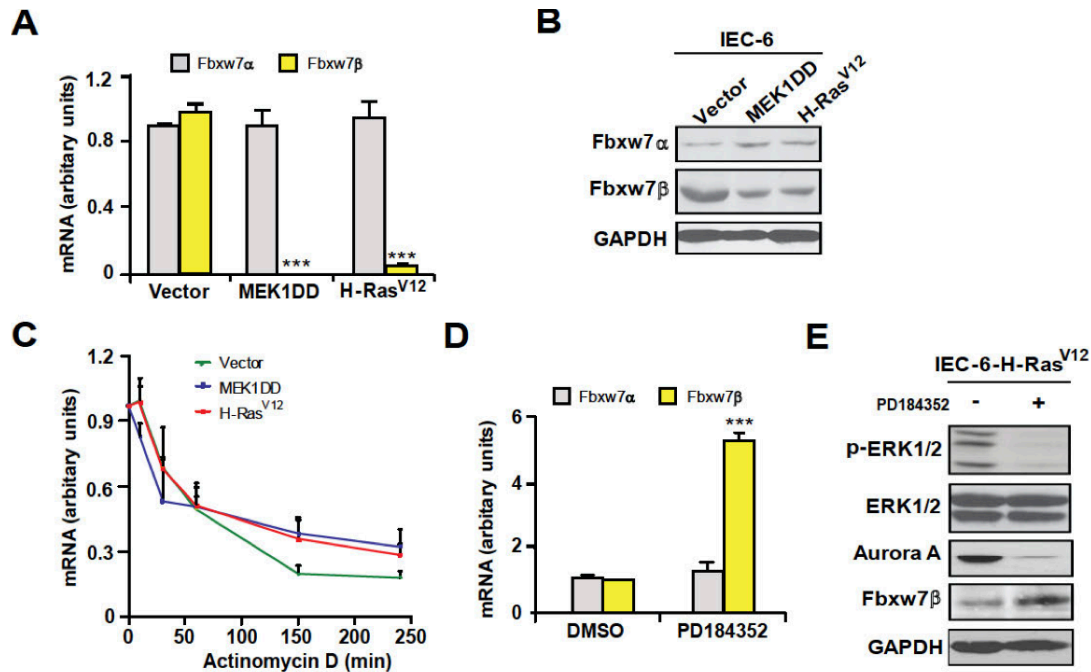
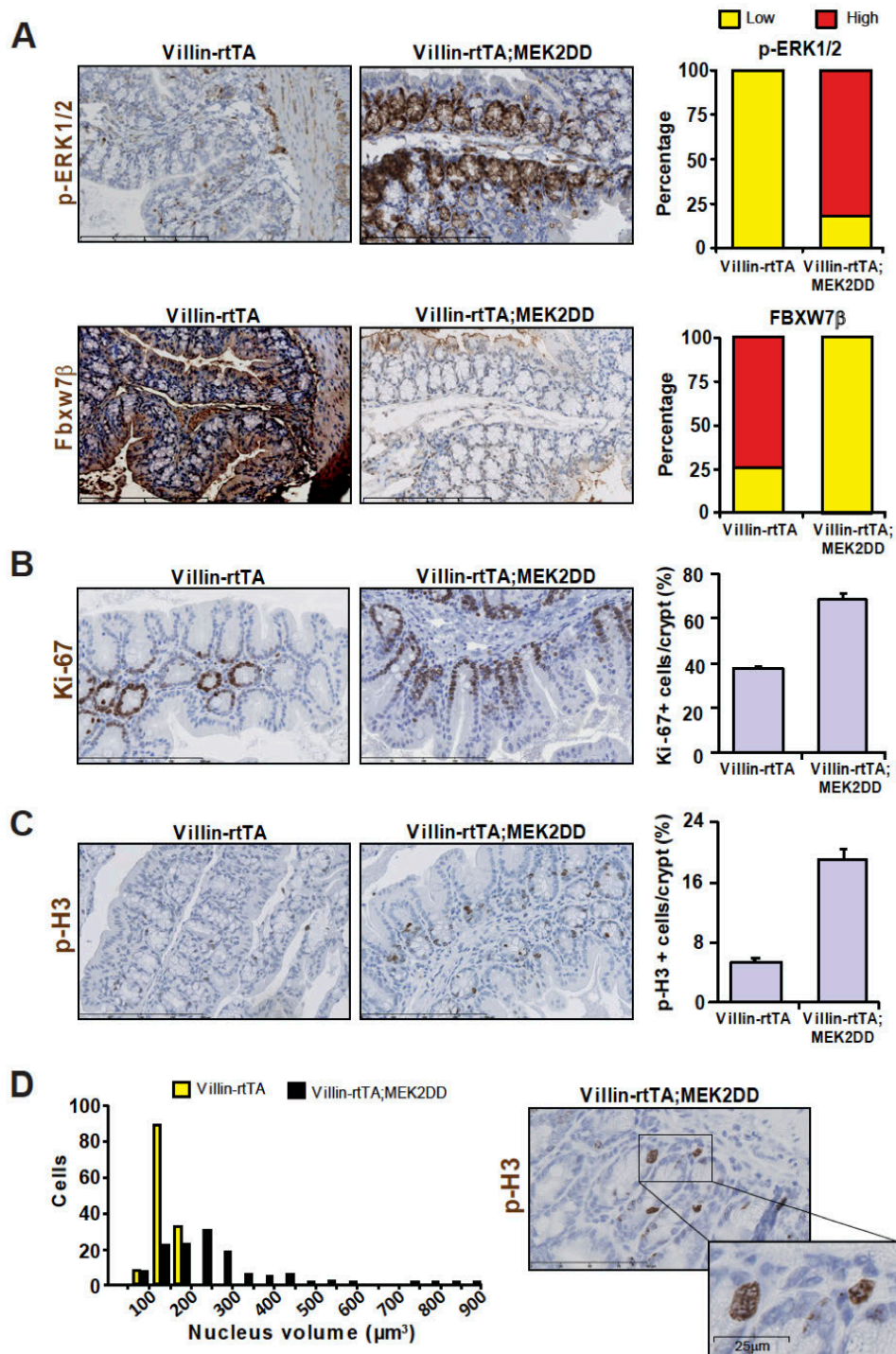


Figure 4. – Hyperactivation of ERK1/2 signaling downregulates Fbxw7 β expression. (A) Quantitative PCR analysis of Fbxw7 isoforms mRNA levels in IEC-6 cells infected with vector, MEK1DD or H-Ras^{V12}. Results are expressed as mean \pm SEM (n=3). (B) Immunoblot analysis of Fbxw7 isoforms protein expression (n=3). (C) **Actinomycin D-chase** analysis of Fbxw7 β mRNA stability in IEC-6 cells infected with vector, MEK1DD or H-Ras^{V12}. Each point corresponds to the mean \pm SEM of 3 individual experiments. (D) Effect of PD184352 on mRNA levels of Fbxw7 isoforms in IEC-6-H-Ras^{V12} cells. Mean \pm SEM (n=3). (E) Effect of PD184352 on protein levels of Fbxw7 β and Aurora A in IEC-6-H-Ras^{V12} cells (n=3). ***, $P < 0.005$.

To address the physiopathological relevance of these cellular studies, we generated a bitransgenic mouse model conditionally expressing activated MEK2DD in the intestine under control of a doxycycline-inducible system (Fig. S4). Induction of MEK2DD and ensuing hyperactivation of ERK1/2 signaling resulted in decreased expression of Fbxw7 β *in vivo* (Fig. 5A), concomitant to an increase in the frequency of Ki-67-positive cells (Fig. 5B) and phospho-histone H3-positive cells (Fig. 5C) in colonic crypts. Notably, the average nucleus size was enlarged (with many nuclei exhibiting atypical morphology) in colon sections of Villin-rtTA;MEK2DD mice, a finding consistent with the presence of polyploid/aneuploid cells (Fig. 5D).



with doxycycline for 10 days. Right, visual quantification of phospho-ERK1/2 and Fbxw7 β staining in control (n=4) and MEK2DD (n=11) mice. (B) Ki-67 staining of colon sections. Right, quantification of Ki-67-positive cells per crypt. Data represent the mean \pm SEM of 150 crypts, 3 mice/group. (C) Phospho-H3 staining of colon sections. Right, quantification of phospho-H3-positive cells per crypt. Mean \pm SEM of 150 crypts, 3 mice/group. (D) Distribution of nuclear size of colonic epithelial cells from Villin-rtTA and Villin-rtTA;MEK2DD mice. Nuclear volume was measured on phospho-histone H3 positive crypt cells. n=150 cells per genotype.

1.5.5 Fbxw7 β isoform regulates Aurora A levels and the accuracy of cell division

To specifically assess the impact of Fbxw7 on Aurora A expression and aneuploidy, the expression of Fbxw7 isoforms was silenced by RNAi in IEC-6 cells. Depletion of Fbxw7 β using two distinct siRNAs caused the upregulation of Aurora A expression, associated with an increase in phospho-histone H3 levels (Fig. 6A). Silencing of Fbxw7 α isoform had no detectable effect. Cycloheximide-chase experiments revealed that depletion of Fbxw7 β increases the half-life of Aurora A from 1h43 \pm 10 min to 6h45 \pm 18 min in IEC-6 cells, consistent with a direct effect on protein turnover (Fig. 6B). Functionally, knock-down of Fbxw7 β expression increased the fraction of IEC-6 cells in G2/M phase (Fig. 6C and S5) and led to the accumulation of cells with >4N DNA content (Fig. 6D). Fbxw7 α depletion also resulted in the accumulation of cells with >4N DNA, without inducing the accumulation of phospho-histone H3-positive cells (Fig. 6C and 6D). Fbxw7 α is known to be a major regulator of cyclin E stability^{26, 27}. Ectopic expression of cyclin E impairs S phase progression, leading to polyploidy and CIN^{28, 29}. In agreement with these observations, cell cycle analysis revealed that IEC-6 cells depleted of Fbxw7 α accumulate in S phase, with no significant change in the proportion of G2/M phase cells (Fig. S5).

Similarly, depletion of Fbxw7 β in human MCF10A cells using validated siRNAs²⁷ targeting either the specific 5' exon of β isoform or the common exon 10 of *FBXW7* gene

upregulated Aurora A expression, while depletion of α or γ isoform had no significant effect (Fig. S6A and S6B). Silencing of Fbxw7 β in MCF10A cells also increased the proportion of cells in G2/M and the frequency of polyploidy/aneuploid cells (Fig. S6C-F). Reciprocally, overexpression of Fbxw7 β isoform, but not Fbxw7 α , in IEC-6-H-Ras^{V12} cells was sufficient to down-regulate Aurora A expression (Fig. 6E). These results identify Fbxw7 β isoform as a specific regulator of Aurora A.

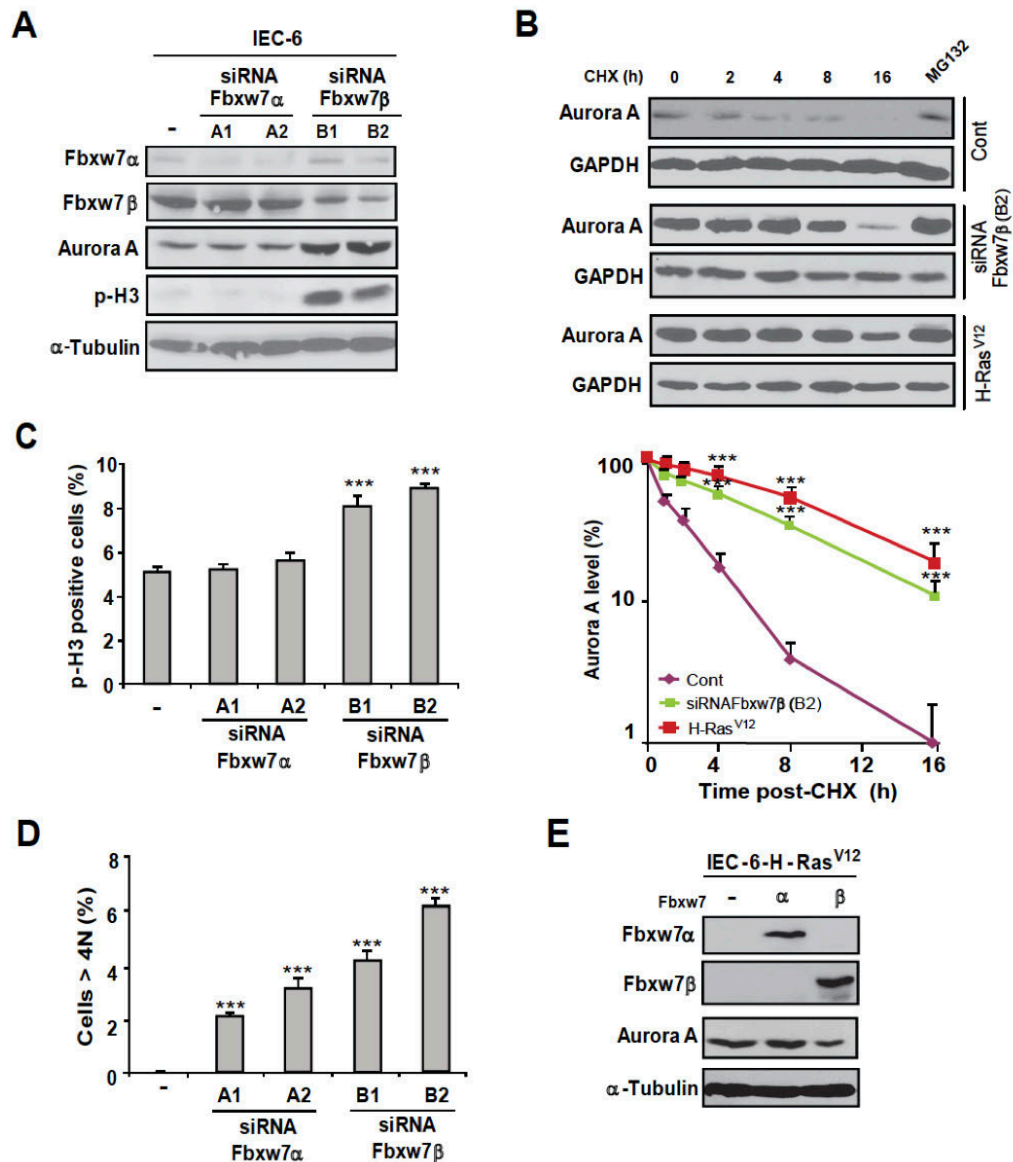


Figure 6. – Fbxw7 β isoform regulates Aurora A levels and the accuracy of cell division. (A) Immunoblot analysis of proliferating IEC-6 cells transfected with siRNAs targeted to Fbxw7 α or Fbxw7 β isoforms (n=4). (B) Cycloheximide-chase analysis of

Aurora A stability. IEC-6 cells were either left untreated or transfected with Fbxw7 β siRNA (B2) or infected with H-Ras^{V12}. After 72 h, cycloheximide (50 μ g/ml) (CHX) was added and the cells were harvested at the indicated times. Aurora A expression was monitored by immunoblotting. Right, quantification of 3 experiments (mean \pm SEM). (C and D) Proportion of cells expressing p-H3 (C) or having >4N DNA content (D) 72 h after transfection of IEC-6 cells with Fbxw7 α or Fbxw7 β siRNAs. Results are expressed as mean \pm SEM (n=4). (E) Immunoblot analysis of Aurora A in proliferating IEC-6 cells infected with retrovirus-encoding Fbxw7 α or Fbxw7 β (n=3).

1.6 Discussion

Aneuploidy is a hallmark of human solid tumors. Paradoxically, large-scale genomics studies have revealed that mutations in genes encoding mitotic regulators are very rare, arguing that changes in the expression or activity of mitotic proteins likely account for the high prevalence of chromosome segregation defects observed in tumors. There is growing evidence that oncogenic signaling pathways, which are universally dysregulated in cancer, not only drive unrestrained cell proliferation and resistance to apoptosis, but also contribute to CIN and aneuploidy¹³. However, the precise mechanisms by which oncogenic signaling events alter the function of mitosis or cytokinesis regulators remain poorly understood. We have shown previously that hyperactivation of the ERK1/2 MAPK pathway induces tetraploidization of intestinal epithelial cells, enhancing their tumorigenic potential¹⁰. Our study now provides mechanistic understanding into how this oncogenic signaling pathway impacts on the regulatory machinery of cell division. We found that aberrant ERK1/2 signaling specifically downregulates the F-box protein Fbxw7 β , resulting in the accumulation of the mitotic kinase Aurora A and cytokinesis failure.

Activating mutations in *RAS* genes occur in $\sim 30\%$ of cancers and are often acquired early in the tumorigenic process^{30, 31}. Several observations suggest that oncogenic Ras signaling may contribute to cancer progression by promoting genomic instability^{13, 14}. Overexpression of oncogenic Ras mutants in various model cell lines was shown to promote chromosome mis-segregation, centrosome amplification, ploidy changes, and induction of CIN. Oncogenic Ras also increases aneuploidization in mice^{14, 32}. How Ras signaling links to CIN and aneuploidy has remained largely unclear. Early work showed that treatment with MEK1/2 inhibitor PD98059 decreases the frequency of Ras-induced micronuclei in thyroid PCCL3 cells, pointing to the involvement of the ERK1/2 signaling branch³³. We show here that hyperactivation of ERK1/2 by H-Ras^{V12} is both necessary and sufficient to impair cytokinesis execution, leading to polyploidization. Importantly, we have identified the mitotic kinase Aurora A as a key effector of this response, providing a mechanistic link between Ras signaling and the cell division

machinery. The Aurora A kinase controls multiple steps of the cell division cycle, including centrosome maturation, mitosis entry, bipolar spindle formation, and cytokinesis^{16, 17}. Its overexpression induces cytokinesis failure and tetraploidization³⁴⁻³⁶; this study). Aurora A is frequently overexpressed in human cancers as a result of gene amplification, but also by other mechanisms such as transcriptional activation and protein stabilization by upregulation of interacting proteins^{16,17}. Our identification of the ERK1/2 pathway as an upstream regulator of Aurora A turnover adds an additional layer of complexity to Aurora A regulation with potentially important implications for cancer biology.

The destruction of Aurora A protein is controlled by multiple ubiquitin ligases, including SCF^{Fbxw7}^{17, 23-25}. The SCF^{Fbxw7} ligase is a tumor suppressor protein that targets multiple oncoproteins for ubiquitylation and degradation through its substrate-binding subunit Fbxw7^{37, 38}. The *FBXW7* gene produces three mRNA transcripts, Fbxw7 α , β and γ , which consist of a specific first exon linked to ten shared exons, allowing for isoform-specific transcriptional control³⁹. Much remain to be learned about the isoform-specific regulation and substrates of the three Fbxw7 isoforms. Here, we uncovered a unique mechanism of regulation of SCF^{Fbxw7} by hyperactive ERK1/2 signaling. We found that activated Ras or MEK markedly downregulates Fbxw7 β mRNA and protein expression in epithelial cells without affecting Fbxw7 α isoform. This effect is reversed by treatment with the MEK1/2 inhibitor PD184352. Acute expression of activated MEK2 in transgenic mouse intestinal cells also decreases the levels of Fbxw7 β protein. *FBXW7* is mutated in 11% of non-hypermuted colorectal carcinomas⁴⁰. However, genetic alterations in the Ras-ERK1/2 pathway are found in 55% of these tumors, suggesting that impairment of Fbxw7 function may be more prevalent than predicted by genomic analysis.

Specific downregulation of Fbxw7 β isoform by H-Ras^{V12} signaling or RNAi silencing caused the accumulation of Aurora A by enhancing its stability. Reciprocally, pharmacological inhibition of the ERK1/2 pathway or ectopic expression of Fbxw7 β lowered Aurora A levels. A similar inverse relationship between Fbxw7 β and Aurora A was observed in human glioma cell lines⁴¹. Concomitant to the upregulation of Aurora A, silencing of Fbxw7 β in intestinal and breast epithelial cells increased the proportion of

polyploid cells. In support of our results, co-deletion of *Fbxw7* and *Trp53* in the mouse intestine was reported to cause aggressive adenocarcinomas that exhibit a CIN phenotype⁴². In conclusion, we propose that the ERK1/2/Fbxw7 β /Aurora A axis identified in this study may contribute to the genomic instability and malignant progression of epithelial cancers.

1.7 Methods

1.7.1 Reagents, plasmids and antibodies

The MEK1/2 inhibitor PD184352 was a gift from Parke-Davis. Plasmids pBabe-HA-H-Ras^{V12} and pBabe-HA-MEK1DD have been described¹⁰. pBabe-puro-Aurora A (hAur-A, plasmid 8510)⁴³ and pCLNR-Neo-H2B-GFP (pCLNR-H2BG, plasmid 17735)⁴⁴ retroviral constructs were purchased from Addgene. Fbxw7 α and Fbxw7 β constructs were kindly provided by KI Nakayama (Kyushu University) and subcloned into pMSCV-hygro vector for retroviral infections.

Commercial antibodies were from the following sources: anti-ERK1/2 from Upstate Biotechnology; anti-phospho-ERK1/2 and anti-phospho-histone H3 from Cell Signaling Technology; anti-HA, anti- α -tubulin, anti-Fbxw7 and anti-GAPDH from Santa-Cruz Biotechnology; anti-Aurora A from Invitrogen. Antibodies for immunohistochemistry: anti-phospho-ERK1/2 from Cell Signaling, anti-Ki-67 from Novus Biologicals and anti-Fbxw7 β from LifeSpan Biosciences.

1.7.2 Cell Culture, transfections and infections

The rat intestinal epithelial cell line IEC-6 was cultured as previously described¹⁰. Human mammary epithelial MCF10A cells were cultured in F12 medium supplemented with 5 ng/ml EGF, 10% fetal bovine serum, 0.5 μ g/ml hydrocortisone, 10 μ g/ml insulin, 2 mM glutamine and antibiotics. Cdh1^{GT/GT} MEFs were obtained from S. Kuninaka (Keio University School of Medicine) and cultured as described⁴⁵.

IEC-6 and MCF10A cells were transfected with siRNAs using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). Cells were infected with retroviral vectors as described⁴⁶ and polyclonal populations of infected cells were selected either for 3 days with 4 μ g/ml puromycin, 5 days with 300 μ g/ml hygromycin or 14 days with 400 μ g/ml G418. IEC-6 cell populations co-expressing MEK1DD, H-Ras^{V12} or Aurora A constructs with H2B-GFP were obtained by simultaneous infection with pBabe-puro-MEK1DD or pBabe-puro-H-

Ras^{V12} or pBabe-puro-Aurora A and pCLNR-Neo-H2B-GFP, followed by selection with puromycin and G418. Infection with shRNA-expressing lentiviruses was carried out as described⁴⁷ and cells were selected with puromycin.

1.7.3 RNA interference reagents

The following TRC lentiviral shRNA constructs for mouse/rat *Aurka* gene were purchased from Sigma: TRCN0000025139 (shAurA-39) and TRCN0000025141 (shAurA-41).

The target sequences of the rat *Fbxw7* siRNAs were:

rFbxw7 α si2, 3'-AUCUACUGAAACAAAGCGGdTdT-5'

rFbxw7 α si3, 5'-CGAACUGGAGGCUCUCUGAdTdT-3'

rFbxw7 β si4, 5'-GUUAGAAUCUGUGACAUAACdTdT-3'²⁴

rFbxw7 β si6, 5'-CAUAGUCUCCUCCAAUAAUdTdT-3'.

The target sequences of the human *FBXW7* siRNAs were:

hFbxw7 Exon 10, 5'-ACAGGACAGUGUUUACAAAdTdT-3'

hFbxw7 α , 5'-GUGAAGUUGUUGGAGUAGAdTdT-3'

hFbxw7 β , 5'-UAUGGGUUUCUACGGCACAdTdT-3',

hFbxw7 γ , 5'-CUACUCUAAACCAUGGCUUdTdT-3'.

1.7.4 Immunoblotting analysis

Cell lysis and immunoblot analysis were performed as described previously⁴⁸.

1.7.5 Live cell imaging

IEC-6 cell populations co-expressing MEK1DD, H-Ras^{V12} or Aurora A with H2B-GFP were plated on 3-cm clear plates (Greiner). After 24 h, the cells were washed twice

with PBS and cultured in 2 ml of imaging medium (Gibco) supplemented with 5 mM HEPES (pH 7.4). All live images were acquired using an epifluorescence microscope (personalDV, Applied Precision). The cells were imaged using a 60X/1.42 NA plan Apo objective. For every field of cells, a stack of 9 z-slices spaced 1.5 μm was collected every 3 min using a 0.15 sec exposure at 10% neutral density filtering in the fluorescence channel for 24 h, in addition to a DIC reference image. Image sequences were viewed and annotated as overlays between maximum intensity projections of the z-stacks with the DIC images using SoftWoRx 3.6.2 and custom written MATLAB programs.

1.7.6 Cell cycle analysis

For cell cycle analysis, exponentially proliferating cells were pulsed with 10 μM BrdU for 2 h. The cells were trypsinized, washed in PBS, fixed in cold 70% ethanol, and kept at -20°C until flow cytometry analysis. For staining, the cells were washed with blocking buffer (0.5% bovine serum albumin in PBS), and DNA was denatured with 2 N HCl in PBS for 20 min. The cells were washed again and incubated for 2 min in 0.1 M sodium borate (pH 8.5) to neutralize remaining HCl. After washing with dilution buffer (blocking buffer with 0.5% Tween 20), the cells were incubated with anti-BrdU antibody (2.5 mg/ml) and/or anti-phospho-histone H3 (pH3) antibody (2.5 mg/ml) for 60 min, followed by washing with dilution buffer and incubation with Alexa Fluor 350-conjugated anti-mouse IgG and/or FITC-conjugated anti-rabbit IgG for 60 min. The cells were then washed with PBS and incubated on ice for 30 min in propidium iodide (PI) buffer (0.1% sodium citrate, 50 mg/ml PI, and 0.2 mg/ml RNase) in the dark. Fluorescence was recorded on a BD LSR II cytometer and the cell cycle distribution or the percentage of phospho-histone H3 positive cells was analyzed using the FACSDiva software (BD Biosciences).

1.7.7 Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random

primers (Applied Biosystems). For the rat Fbxw7 alpha and beta isoforms, gene expression levels were measured using custom designed assays. For all other genes, gene expression was measured using Universal ProbeLibrary assays (Roche). The sequences of primers and probes are available upon request. Analysis of PCR product amplification was performed on the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) and GAPDH genes were used as endogenous controls for rat and human cells. The relative level of target gene expression was quantified by using the ddCT method.

1.7.8 mRNA stability assay

IEC-6 cells were treated with actinomycin D (10 μ g/ml) for the indicated times. Total RNA was extracted and the expression of Fbxw7 β mRNA was measured by quantitative PCR.

1.7.9 MEK2DD transgenic mice

The MEK2DD transgenic construct was generated by cloning the human MEK2S222D/S226D (MEK2DD) mutant cDNA downstream of a heptameric *TetO* element fused to a minimal CMV promoter (Fig. S4a). The construct was injected into fertilized eggs and 6 transgenic founders were identified by Southern blotting and further analyzed for inducibility and repressibility of the transgene. MEK2DD founder lines were bred to Villin-rtTA transgenic mice, which express the reverse tetracycline-regulated transactivator (rtTA) specifically in the gastrointestinal epithelium⁴⁹. Bitransgenic Villin-rtTA;MEK2DD mice were found to express MEK2DD exclusively upon doxycycline induction in a dose-dependent manner (Fig. S4b). As expected, MEK2DD expression led to a marked increase in the activating phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 5a). To evaluate the impact of MEK2 hyperactivation in the intestine, bitransgenic Villin-rtTA;MEK2DD and littermate monotransgenic Villin-rtTA control mice were fed with 500 μ g/ml doxycycline at 6 weeks of age for the indicated times. All mice were housed under specific-pathogen free conditions, and experiments were performed in accordance with the Canadian

Council on Animal Care guidelines and with Université de Montréal Institutional Animal Care and Use Committee approval.

1.7.10 Immunohistochemistry

The colons from transgenic mice were dissected, fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and processed for histopathological analysis. For immunohistochemical staining, colon specimens were deparaffinized in an automated immunostainer (Discovery XT, Ventana Medical Systems). Heat-induced epitope retrieval (HIER) and blocking steps were performed using proprietary reagents (Cell Conditioner 1 and 2, Inhibitor D and Blocker D included in DABmap detection kit (Ventana Medical Systems)). Sections were then incubated with anti-phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology; 1:100), anti-Fbxw7 β (LifeSpan Biosciences; 1:100), or anti-phospho-histone H3 (Cell Signaling Technology; 1:50) antibody for 1 h at room temperature. Bound antibody was detected with biotin-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody at 1:100 dilution (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Nuclei were counterstained with haematoxylin. For measurement of nucleus volume, colon sections were stained with anti-phospho-histone H3 antibody to label cells in G2/M phase. Microscopic fields were randomly selected and the diameter of the nucleus was measured along the major and minor axes. The mean value of the two diameters was used to calculate the nucleus volume using the equation $v = (4/3) \pi r^3$. A total of 150 phospho-histone H3 positive cells were scored for each genotype. To assess the correlation of phospho-ERK1/2 and Fbxw7 β staining, colon sections were scored blinded by two readers.

1.7.11 Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. Unpaired t test was performed unless otherwise indicated (Excel).

1.8 Acknowledgement

We thank K.I. Nakayama, S. Kuninaka, X. Yang and P. Roux for reagents, L. Gaboury, J. Hinsinger and C. Danila for immunohistochemistry analysis, and A.S. Maddox, V. Archambault, M. Therrien, A. Verreault and G. Sauvageau for helpful discussions. This work was supported by grants from the Cancer Research Society (S.M.), the Canadian Institutes of Health Research (S.M.) and the National Cancer Institute of Canada (P.S.M.). S.D. is recipient of studentships from the Cole Foundation and Canadian Institutes of Health Research, and J.F.D. is a fellow of the Swiss National Science Foundation. P.S.M. and S.M. hold the Canada Research Chair in Cell Division and Chromosomal Organization and Cellular Signaling, respectively.

1.9 References

1. Holland AJ, Cleveland DW. Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO Rep* 2012; 13:501-14.
2. McGranahan N, Burrell RA, Endesfelder D, Novelli MR, Swanton C. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Rep* 2012; 13:528-38.
3. Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet* 2012; 13:189-203.
4. Pfau SJ, Amon A. Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man. *EMBO Rep* 2012; 13:515-27.
5. Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, Lantermann AB, Ivanova EV, Pan Y, et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 2012; 482:53-8.
6. Janssen A, van der Burg M, Szuhai K, Kops GJ, Medema RH. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science* 2011; 333:1895-8.
7. Sheltzer JM, Blank HM, Pfau SJ, Tange Y, George BM, Humpton TJ, et al. Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science* 2011; 333:1026-30.
8. Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27:585-610.
9. Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17:157-62.
10. Duhamel S, Hebert J, Gaboury L, Bouchard A, Simon R, Sauter G, et al. Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation. *Cancer Res* 2012; 72:626-35.

11. Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005; 437:1043-7.
12. Davoli T, de Lange T. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer cell* 2012; 21:765-76.
13. Orr B, Compton DA. A double-edged sword: how oncogenes and tumor suppressor genes can contribute to chromosomal instability. *Front Oncol* 2013; 3:164.
14. Kamata T, Pritchard C. Mechanisms of aneuploidy induction by RAS and RAF oncogenes. *Am J Cancer Res* 2011; 1:955-71.
15. Barr FA, Gruneberg U. Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* 2007; 131:847-60.
16. Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:42-50.
17. Nikonova AS, Astsaturov I, Serebriiskii IG, Dunbrack RL, Jr., Golemis EA. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70:661-87.
18. Marumoto T, Honda S, Hara T, Nitta M, Hirota T, Kohmura E, et al. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem* 2003; 278:51786-95.
19. Vader G, Lens SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1786:60-72.
20. Castro A, Arlot-Bonnemains Y, Vigneron S, Labbe JC, Prigent C, Lorca T. APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep* 2002; 3:457-62.

21. Littlepage LE, Ruderman JV. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* 2002; 16:2274-85.
22. Taguchi S, Honda K, Sugiura K, Yamaguchi A, Furukawa K, Urano T. Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1. *FEBS Lett* 2002; 519:59-65.
23. Fujii Y, Yada M, Nishiyama M, Kamura T, Takahashi H, Tsunematsu R, et al. Fbxw7 contributes to tumor suppression by targeting multiple proteins for ubiquitin-dependent degradation. *Cancer Sci* 2006; 97:729-36.
24. Kwon YW, Kim IJ, Wu D, Lu J, Stock WA, Jr., Liu Y, et al. Pten regulates Aurora-A and cooperates with Fbxw7 in modulating radiation-induced tumor development. *Mol Cancer Res* 2012; 10:834-44.
25. Mao JH, Perez-Losada J, Wu D, Delrosario R, Tsunematsu R, Nakayama KI, et al. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature* 2004; 432:775-9.
26. Grim JE, Gustafson MP, Hirata RK, Hagar AC, Swanger J, Welcker M, et al. Isoform- and cell cycle-dependent substrate degradation by the Fbw7 ubiquitin ligase. *J Cell Biol* 2008; 181:913-20.
27. van Drogen F, Sangfelt O, Malyukova A, Matskova L, Yeh E, Means AR, et al. Ubiquitylation of cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms. *Mol Cell* 2006; 23:37-48.
28. Minella AC, Swanger J, Bryant E, Welcker M, Hwang H, Clurman BE. p53 and p21 form an inducible barrier that protects cells against cyclin E-cdk2 deregulation. *Curr Biol* 2002; 12:1817-27.
29. Spruck CH, Won KA, Reed SI. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 1999; 401:297-300.

30. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:295-308.
31. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:D945-50.
32. Baker DJ, Dawlaty MM, Wijshake T, Jeganathan KB, Malureanu L, van Ree JH, et al. Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan. *Nat Cell Biol* 2013; 15:96-102.
33. Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, et al. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene* 2000; 19:3948-54.
34. Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 2003; 3:51-62.
35. Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J* 2002; 21:483-92.
36. Wang X, Zhou YX, Qiao W, Tominaga Y, Ouchi M, Ouchi T, et al. Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. *Oncogene* 2006; 25:7148-58.
37. Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:83-93.
38. Davis RJ, Welcker M, Clurman BE. Tumor suppression by the Fbw7 ubiquitin ligase: mechanisms and opportunities. *Cancer Cell* 2014; 26:455-64.

39. Spruck CH, Strohmaier H, Sangfelt O, Muller HM, Hubalek M, Muller-Holzner E, et al. hCDC4 gene mutations in endometrial cancer. *Cancer Res* 2002; 62:4535-9.
40. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487:330-7.
41. Gu Z, Inomata K, Ishizawa K, Horii A. The FBXW7 beta-form is suppressed in human glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354:992-8.
42. Grim JE, Knoblaugh SE, Guthrie KA, Hagar A, Swanger J, Hespelt J, et al. Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer. *Mol Cell Biol* 2012; 32:2160-7.
43. Crane R, Kloepfer A, Ruderman JV. Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J Cell Sci* 2004; 117:5975-83.
44. Kanda T, Sullivan KF, Wahl GM. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* 1998; 8:377-85.
45. Naoe H, Araki K, Nagano O, Kobayashi Y, Ishizawa J, Chiyoda T, et al. The anaphase-promoting complex/cyclosome activator Cdh1 modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation. *Mol Cell Biol* 2010; 30:3994-4005.
46. Rodier G, Makris C, Coulombe P, Scime A, Nakayama K, Nakayama KI, et al. p107 inhibits G1 to S phase progression by down-regulating expression of the F-box protein Skp2. *J Cell Biol* 2005; 168:55-66.
47. Voisin L, Julien C, Duhamel S, Gopalbhai K, Claveau I, Saba-EI-Leil MK, et al. Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer* 2008; 8:337.

48. Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* 2000; 148:543-56.
49. Roth S, Franken P, van Veelen W, Blonden L, Raghoebir L, Beverloo B, et al. Generation of a tightly regulated doxycycline-inducible model for studying mouse intestinal biology. *Genesis* 2009; 47:7-13.

1.10 Supplementary figures

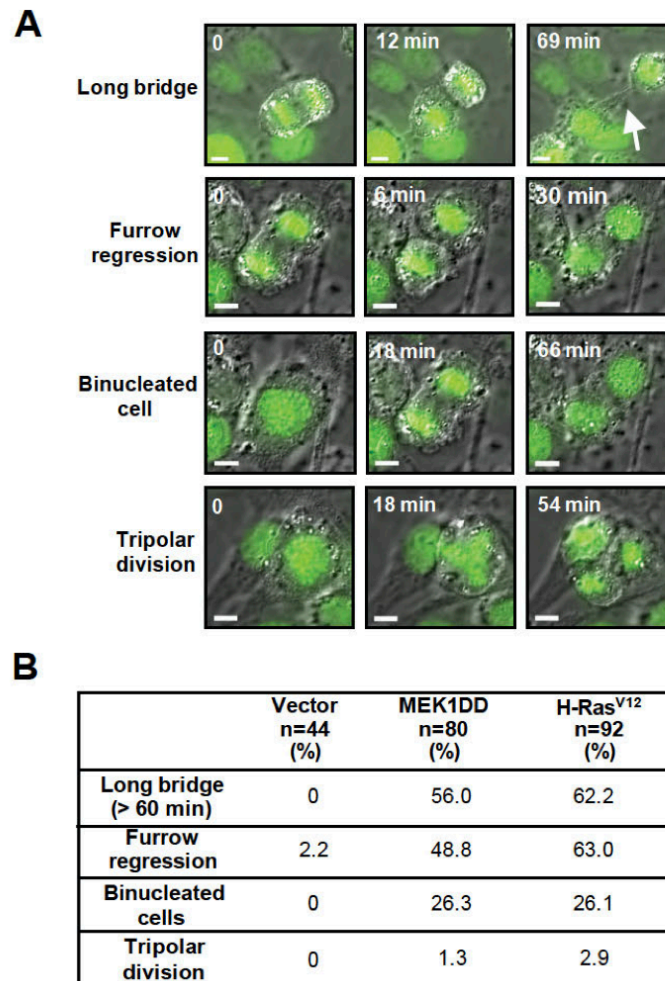


Figure S1. – Hyperactivation of Ras or MEK signaling leads to cell division defects. (A) Representative examples of abnormal cell divisions in IEC-6 cells infected for two weeks with H-Ras^{V12}. (B) Quantification of cell division defects in IEC-6 cell populations expressing empty vector (n=44), MEK1DD (n=80) or H-Ras^{V12} (n=92) two weeks post-infection. Arrow, intercellular bridge.

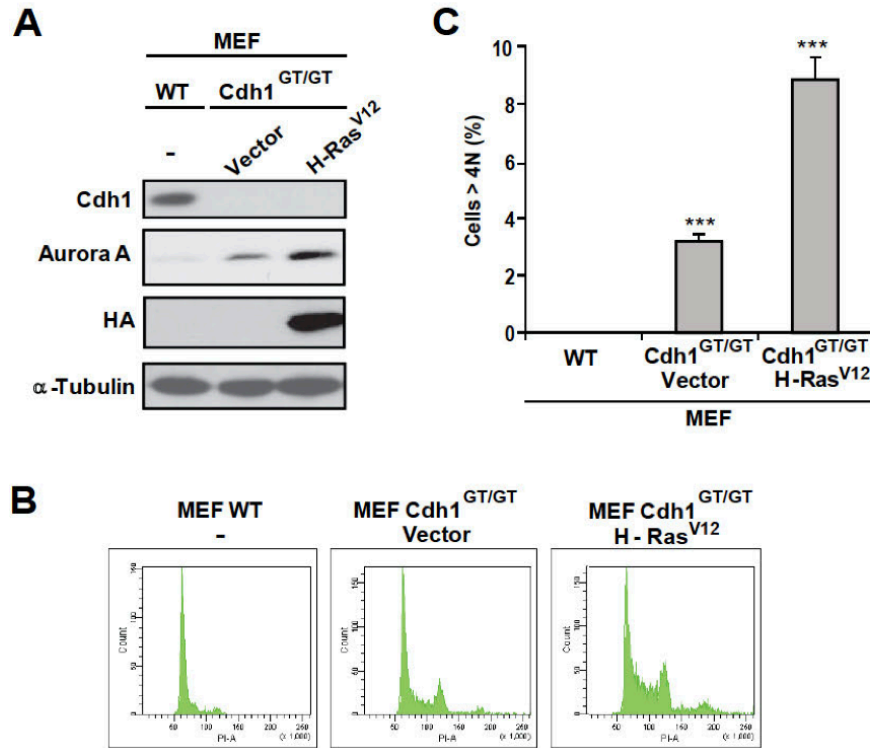


Figure S2. – Oncogenic activation of Ras upregulates Aurora A expression in Cdh1^{GT/GT} MEFs. (A) Immunoblot analysis of proliferating control (WT) or Cdh1^{GT/GT} MEFs infected with vector or H-Ras^{V12} (n=3). (B) Representative cell cycle profiles of MEFs infected for 7 days with vector or H-Ras^{V12} (n=3). (C) Proportion of cells with >4N DNA content (n=3). ***, $P < 0.005$.

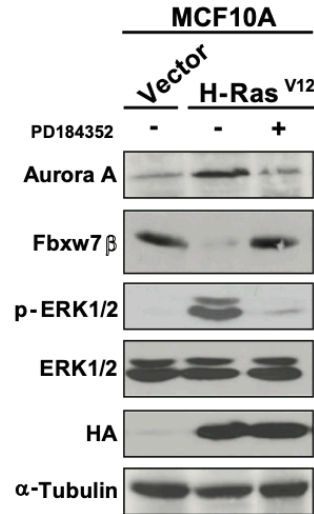


Figure S3. – Hyperactivation of ERK1/2 signaling by oncogenic Ras downregulates Fbxw7 β expression in mammary epithelial MCF10A cells. Immunoblot analysis of MCF10A cells infected with vector or H-Ras^{V12} and treated or not with PD184352.

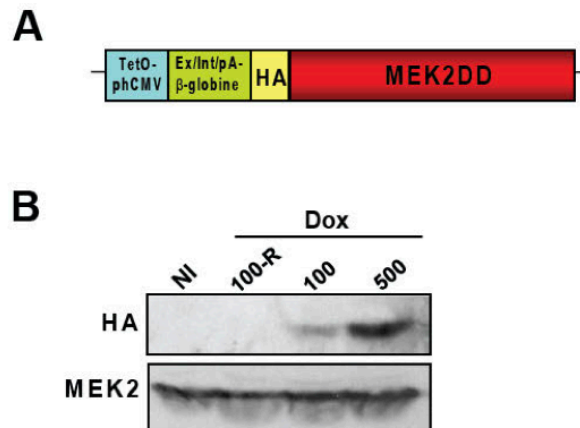


Figure S4. – Generation of a transgenic mouse model conditionally expressing activated MEK2DD in the intestine. (A) Schematic diagram of the doxycycline-inducible MEK2DD transgenic construct. (B) Immunoblot analysis of intestinal tissue extracts from Villin-rTA;MEK2DD bitransgenic mice treated as follow: not induced (NI); induced with 100 μ g/ml doxycycline for 7 days followed by removal of doxycycline for 14 days (100-R); induced with 100 μ g/ml (100) or 500 μ g/ml (500) doxycycline for 7 days.

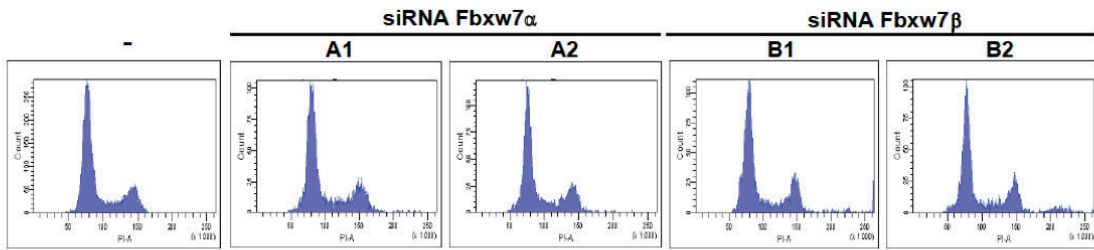
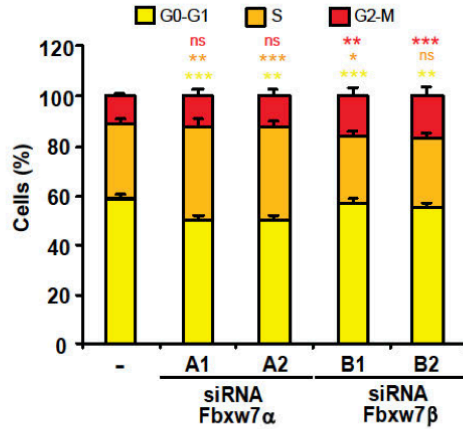
A**B**

Figure S5. – Fbxw7 isoforms regulate the accuracy of cell division. (A) Representative cell cycle profiles of IEC-6 cells transfected with siRNAs targeting Fbxw7 α or Fbxw7 β isoform (n=4). (B) Proportion of cells in each cell cycle phase (n=3). ns, non significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$.

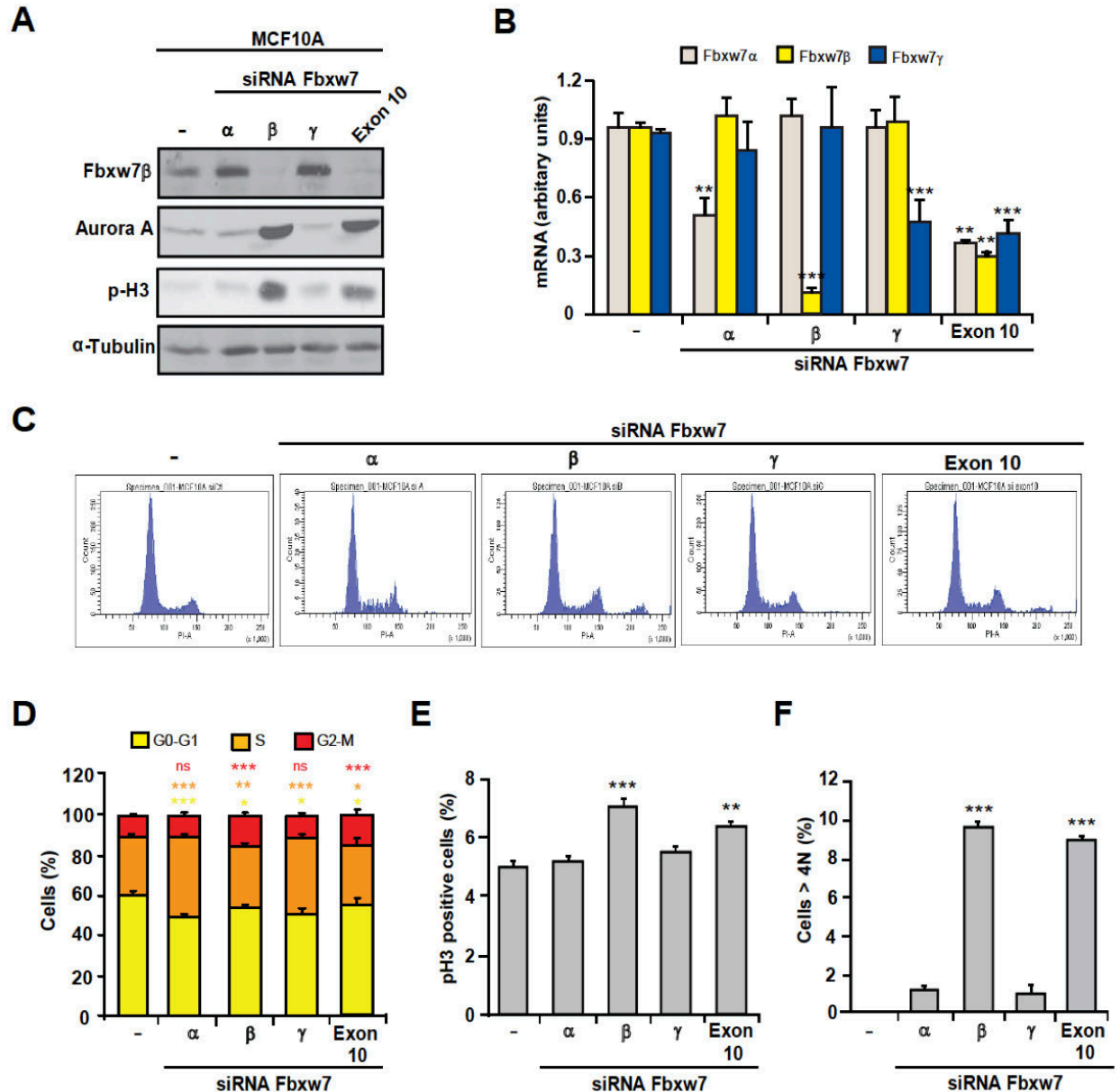


Figure S6. – Fbxw7 β isoform specifically regulates Aurora A levels in MCF10A cells. (A) Immunoblot analysis of proliferating MCF10A cells transfected with siRNAs targeted to Fbxw7 α , Fbxw7 β , Fbxw7 γ or Fbxw7 common exon 10 (n=3). (B) Quantitative PCR analysis of Fbxw7 isoforms mRNA levels in MCF10A cells treated as in A. Mean \pm SEM (n=3). (C) Representative cell cycle profiles of MCF10A cells transfected with siRNAs specifically targeting Fbxw7 isoforms or the common exon 10 (n=3). (D) Proportion of cells in each cell cycle phase (n=3). (E and F) Proportion of cells expressing p-H3 (E) or having >4N DNA content (F) in MCF10A cells transfected with indicated Fbxw7 siRNAs. Results are expressed as mean \pm SEM (n=3). ns, non significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$.

Annexe II

2 Loss of Interleukin-17 Receptor D modulates lipid metabolism

Charlotte Girondel^{1,2}, Nadjima Djendar³ and Sylvain Meloche^{1,2,4}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, Quebec, Canada.

²Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

³Department of Oncology, Université Claude Bernard, Lyon, France

⁴Molecular Biology Program, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence and requests for materials should be addressed to:

Dr Sylvain Meloche (email: sylvain.meloche@umontreal.ca)

2.1 Contribution des auteurs

Charlotte Girondel a conceptualisé le projet, mis en place et exécuté la majorité des expériences et analysé les résultats.

Nadjima Djendar a exécuté les expériences cellulaires de la Figure 2.

Sylvain Meloche a conceptualisé le projet et analysé les résultats.

2.2 Mise en contexte et résultats

Il est maintenant accepté que les tumeurs reprogramment leur acquisition de nutriments et leur métabolisme pour combler les demandes bioénergétiques, biosynthétiques et redox de la cellule maligne. Cette reprogrammation des activités métaboliques est reconnue comme une caractéristique du cancer et plusieurs voies peuvent être activées pour permettre ces fonctions.

Premièrement, dans le contexte de CAC induit par AOM-DSS, l'analyse du séquençage d'ARN des tumeurs a mis en évidence plusieurs signatures liées au métabolisme lipidique (**Figure 1A**). Ces signatures font intervenir la perte d'expression de plusieurs apolipoprotéines (p. ex., APOA1, APOA2, APOA4) et la lipoprotéine lipase (LPL) impliquées dans l'assimilation des acides gras par le foie. Le pool de cholestérol et d'acides gras peut provenir de leur propre synthèse par le foie mais également de sources exogènes. Les lipoprotéines exogènes sont empaquetées en lipoprotéines de haute densité (HDL) à l'aide de différentes protéines de transport ou apolipoprotéines, puis la lipoprotéine lipase permet leur transformation en lipoprotéine de très basse densité (VLDL) et basse densité (LDL) capables d'entrer dans la cellule du foie et compléter le pool d'acides gras déjà présent dans la cellule (**Figure 1B**). Nous avons confirmé la perte d'expression des transporteurs APOA1-4 par RT-qPCR sur les tumeurs WT et *Il17rd^{-/-}* et d'APOA1 sur les foies de souris de 24 mois. Cependant, la LPL ne semble pas être régulée dans ces conditions (**Figure 1C, D**).

Deuxièmement, en parallèle de l'assimilation des acides gras, une lipogenèse *de novo* peut avoir lieu pour produire de nouveaux acides gras dans le foie. Le glucose, absorbé par le transporteur de glucose, entre dans la voie glycolytique et génère le pyruvate. Ce pyruvate est converti en acétyl-CoA qui alimente le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). Le citrate produit sort de la mitochondrie et est reconverti en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA carboxylase (ACACA ou ACC) agit sur cet acétyl-CoA produisant du malonyl-CoA qui est ensuite utilisé comme substrat pour la production de palmitate saturé par la principale enzyme biosynthétique synthase des acides gras (FASN). Après une série de réactions, le palmitate est converti en acides gras (**Figure 2A**). Nous avons observé une tendance à l'augmentation de plusieurs effecteurs de cette voie chez les

souris vieillissantes de 24 mois tels que le facteur de transcription *srebp1* et les enzymes *acaca*, *fasn* et *scd1* (**Figure 2B**). Afin d'investiguer l'impact d'IL-17RD sur la lipogenèse *de novo*, nous avons évalué l'expression de ces effecteurs dans des lignées hépatiques normales et cancéreuses suite à un traitement par siRNA contre IL-17RD. Nous avons observé une augmentation constante et significative des gènes *acaca* et *fasn* et dans certains cas du gène *scd1* dans les lignées H2.35, SNU449 et SK-HEP1 (**Figure 2C**) alors qu'aucune différence n'a été observée dans les lignées HEPG2, HUH7 et PLC.

Finalement, une analyse biochimique à partir de sérum de souris de 12 semaines ne montre aucune différence de glycémie (c. à-d. glucose dans le sérum), aucun dysfonctionnement hépatique (c. à-d. ALT et AST dans le sérum) mais une augmentation significative des triglycérides à l'état basal (**Figure 3**).

Globalement, ces résultats suggèrent un potentiel rôle d'IL-17RD dans le transport des lipides du foie et/ou dans la lipogenèse *de novo*. Bien qu'un grand nombre d'expériences soient encore nécessaires pour confirmer cette hypothèse et en comprendre les mécanismes, cette étude a permis d'identifier une nouvelle fonction d'IL-17RD associée aux fonctions métaboliques reliées au cancer.

2.3 Figures

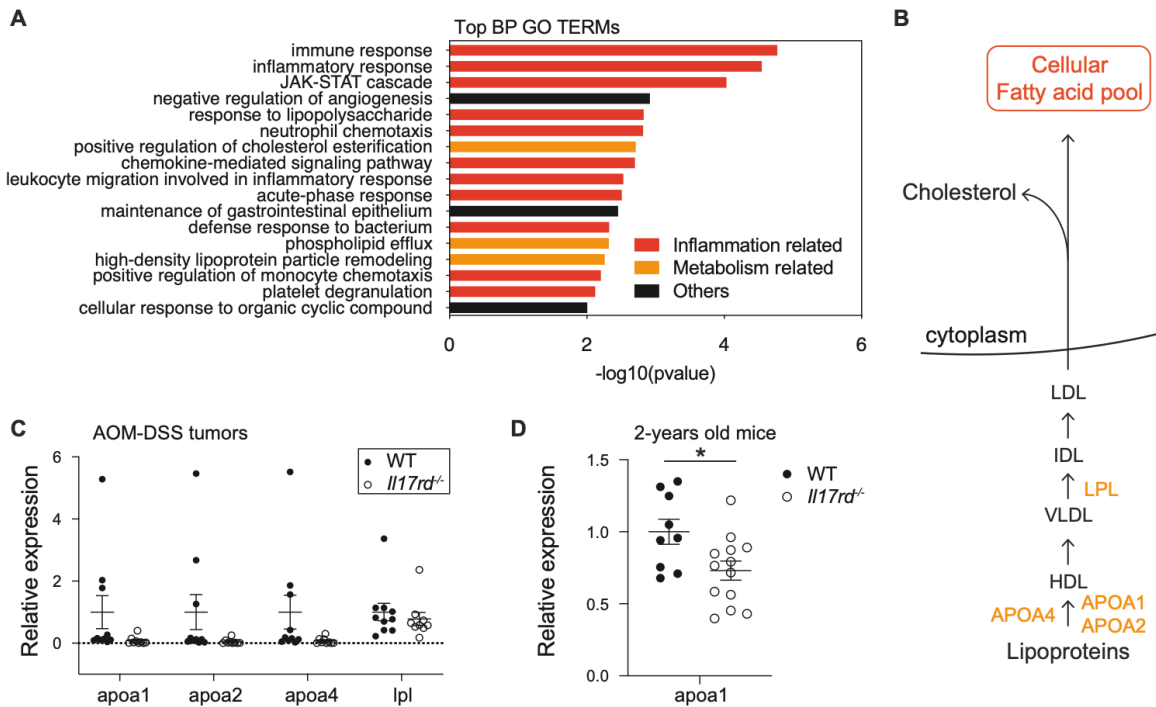


Figure 1. – La perte d’IL-17RD inhibe l’expression d’apolipoprotéines. (A) Analyse d’enrichissements GO de gènes différentiellement exprimés montrant le top 17 des processus biologiques (BP) enrichis dans les tumeurs *Il17rd*^{-/-} ($p < 0.05$). (B) Schéma récapitulatif de la voie de consommation des acides gras. (C) Expression relative des niveaux d’ARNm des transporteurs et de la lipoprotéine lipase dans les tumeurs WT et *Il17rd*^{-/-} mesurée par RT-qPCR. Les données sont les moyennes \pm SEM ($n = 10$). (D) Expression relative des niveaux d’ARNm du transporteur APOA1 dans les foies de souris WT et *Il17rd*^{-/-} mesurée par RT-qPCR. Les données sont les moyennes \pm SEM ($n = 9$ pour le groupe WT et $n = 13$ pour le groupe *Il17rd*^{-/-}).

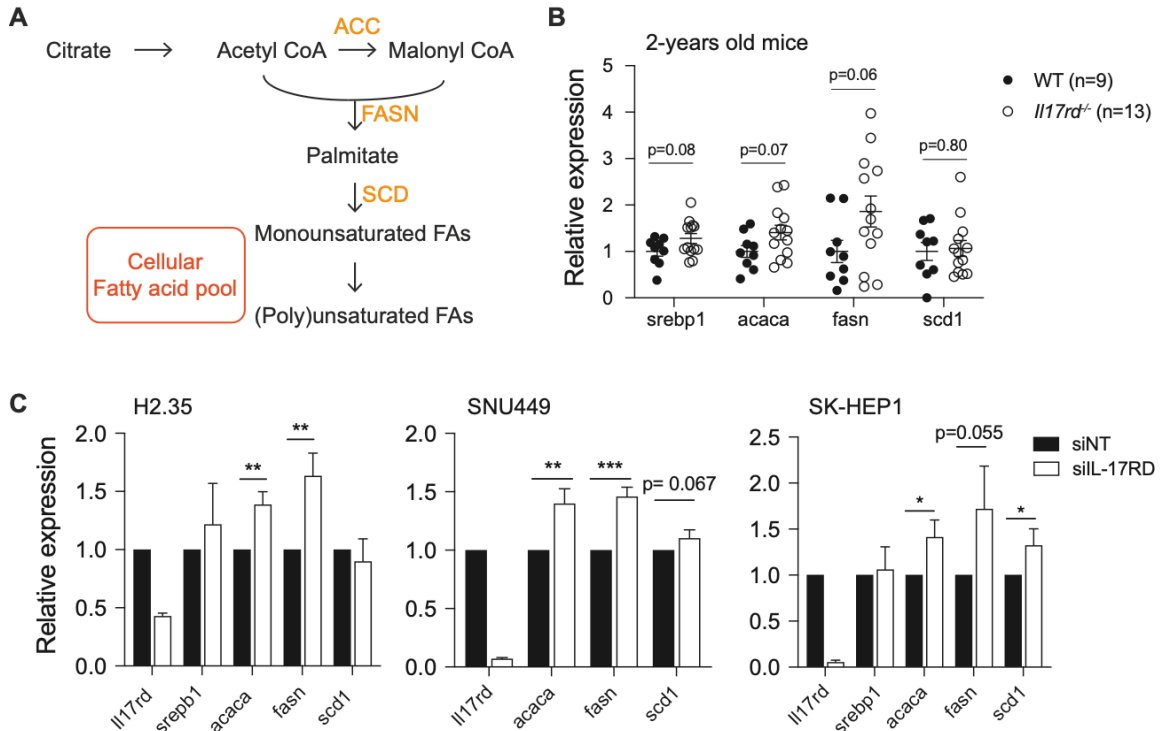


Figure 2. – IL-17RD inhibe la production d’enzymes de la lipogenèse *de novo*. (A) Schéma récapitulatif de la lipogenèse *de novo* dans le foie. (B) Expression relative des niveaux d’ARNm d’enzymes dans les foies de souris WT et *Il17rd^{-/-}* mesurée par RT-qPCR. Les données sont les moyennes ± SEM (n= 9 pour le groupe WT et n = 13 pour le groupe *Il17rd^{-/-}*). (C) Les différents types de cellules hépatiques ont été transfectés avec un siARN contrôle ou contre *Il17rd*, et l’expression relative des niveaux d’ARNm d’enzymes a été mesurée par RT-qPCR. Les données sont les moyennes ± SD (n= 3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

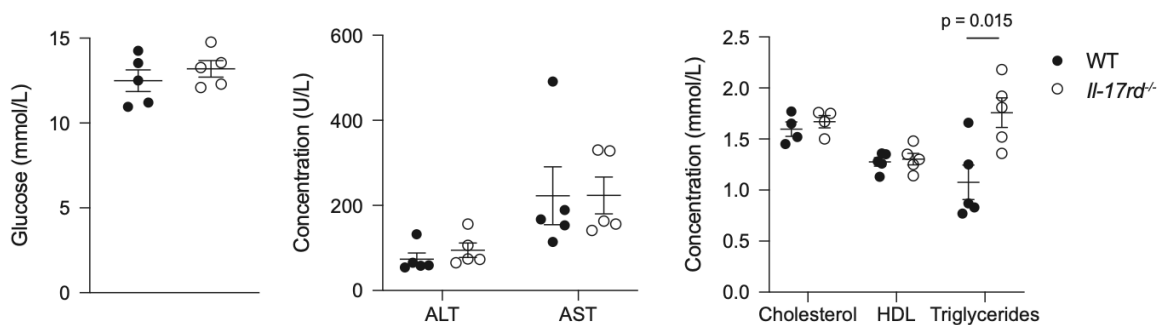


Figure 3. – La perte d’IL-17RD induit une augmentation de triglycérides dans le sang. Le sérum de souris WT et *Il17rd^{-/-}* récolté a été testé pour les marqueurs cités. Les données sont les moyennes ± SEM (n = 5). Abréviations : ALT, Alanine aminotransférase; AST, Aspartate aminotransférase; HLD, lipoprotéine de haute densité.