

## Thesis, COLLÉGIALITÉ, FRANZEN Rachelle

**Auteur :** Eelen, Chloé

**Promoteur(s) :** Bellahcene, Akeila

**Faculté :** Faculté de Médecine

**Diplôme :** Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

**Année académique :** 2024-2025

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/23183>

---

### Avertissement à l'attention des usagers :

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

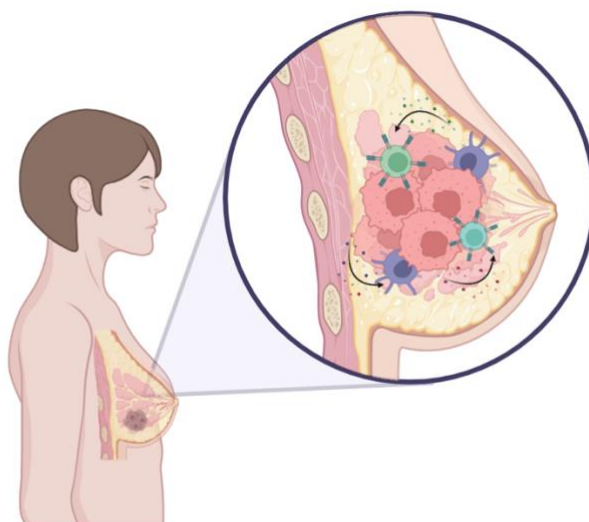
# Étude du stress glycant dans le cancer du sein : impact sur l'immunité anti-tumorale

Chloé EELEN

Mémoire de Master en Sciences Biomédicales

Promoteur : Pr. Akeila Bellahcène

2024 - 2025





## Remerciement

Tout d'abord, je tiens à remercier les professeurs **Akeila Bellahcène** et **Olivier Peulen** de m'avoir ouvert les portes du Laboratoire de Recherche sur les Métastases à l'Institut GIGA de l'Université de Liège. Je tiens à remercier plus particulièrement la Pr. A. Bellahcène, en tant que promotrice de ce mémoire, pour son encadrement et son soutien tout au long de ce mémoire. Son exigence bienveillante et sa confiance en moi m'ont permis d'enrichir mon travail et mon parcours.

Je souhaite également remercier **Victoria Mohring**, qui a été ma personne de référence durant ces 5 mois de travail, pour tous ses conseils, ses explications ainsi que son encadrement pour construire ce mémoire mais aussi pour toute la gentillesse et le soutien apportés à mon égard durant ce projet.

Je tiens également à remercier l'ensemble de la MG Team, **Fanny Lardinois**, **Valentine Delmotte**, **Alice Putzu**, ainsi que **Ferman Agirman** et **Naïma Maloujahmoum**, pour leur accueil chaleureux, leur aide précieuse et une ambiance de travail conviviale sans lesquels ce mémoire n'aurait pas été pareil. Je tiens aussi à remercier l'équipe du professeur Peulen, **Emilie Laverdeur** et **Laury Désiront**, d'avoir également contribué à cet accueil et cette convivialité.

Je n'oublie pas **mes proches**, qui m'ont constamment soutenue et encouragée durant ce projet. Leur patience, leur bienveillance et leur écoute ont été essentiels dans les moments de doute. Ainsi que **mes amis**, sans qui ces années de master n'auraient pas été aussi riches en rires et en bons moments, couronnées par un voyage inoubliable gravé à jamais dans ma mémoire.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de ce mémoire.

À toutes et à tous, merci du fond du cœur.

Chloé

## Abréviations

A-T	Adénine-thymine
A.U.	<i>Arbitrary units</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	<i>Advanced glycation end product</i>
AKR	Aldo-kéto réductase
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
AMOO	<i>Acetol mono-oxygenase</i>
ARG-1	Arginase 1
ArgPyr	Argpyrimidine
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	Acide bicinchoninique
BER	<i>Base excision repair</i>
BSA	<i>Bovin serum albumin</i>
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i>
CEL	<i>Carboxyethyl lysine</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
dG	Déoxyguanosine
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DMBG	Diméthylbiguanide
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
F1,6BP	Fructose-1,6-biphosphate
F6P	Fructose-6-phosphate
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovin serum</i>
FMO	<i>Full minus one</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
FSC-A	<i>Forward scatter area</i>
FSC-H	<i>Forward scatter height</i>
G6P	Glucose-6-phosphate
GADP	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GLO1	Glyoxalase 1
GLO2	Glyoxalase 2

GSH	Glutathion réduit
HSR	<i>Heat shock response</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IFN	Interféron
IL	Interleukine
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene 3</i>
LDHA	Lactate déshydrogénase A
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MG	Méthylglyoxal
MG-H	<i>MG-derived hydroimidazolone</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MODIC	<i>Methylglyoxal-derived imidazolium crosslink</i>
MOLD	<i>Methylglyoxal lysine dimer</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Monoxyde d'azote
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PD-1/PD-L1	<i>Programmed cell death protein 1/ Programmed death-ligand 1</i>
PR	<i>Progesterone receptor</i>
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Rotations par minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SSAO	<i>Semicarbazide-sensitive amine oxidase</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
TAN	<i>Tumor-associated neutrophil</i>
TBS-t	<i>Tris-buffered-saline-tween</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF	<i>Transforming growth Factor</i>
THP	Tétrahydropyrimidines

TIL	<i>Tumor-infiltrating lymphocyte</i>
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin domain 3</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>

## Résumé

De nos jours, il est bien documenté que les cellules cancéreuses reposent sur un métabolisme particulier connu sous le nom d'« effet Warburg », qui repose entre-autre sur la glycolyse aérobie. Une des conséquences de l'usage préférentiel de la voie de la glycolyse est la formation accrue d'un sous-produit glycolytique appelé le méthylglyoxal (MG). Le MG est en réalité une molécule hautement réactive grâce sa capacité puissante de glycation puisqu'il peut réagir avec les protéines, les lipides et l'ADN pour former des produits de glycation avancés (AGEs). Les AGEs impactent le bon fonctionnement des cellules et provoque un stress glycant ou stress MG. Ces AGEs sont impliqués dans certaines maladies y compris le cancer, pour lequel l'impact du MG a été démontré à travers plusieurs études ces dix dernières années.

En dehors de son implication sur la cancérogenèse en tant que telle, il a été démontré que les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) sont capables de transférer du MG à des lymphocytes T par contact intercellulaire. Le MG transféré provoque une paralysie fonctionnelle de ces lymphocytes alors qu'ils sont bien connus pour participer à l'immunité anti-tumorale. À la suite de cette découverte, une question émerge : les cellules cancéreuses, étant donné qu'elles reposent sur la glycolyse et qu'elles produisent par conséquent une quantité importante de MG, sont-elles capables de transférer du MG directement aux lymphocytes ? Et quel en serait l'impact ?

Pour répondre à ces questions, nous avons d'abord utilisé l'imagerie cellulaire pour tenter d'observer ce transfert de MG. En utilisant différents microscopes et marquages, nous avons conclu que du MG était transféré des cellules cancéreuses aux lymphocytes mais sans indication d'un contact entre les cellules. Nous avons ensuite étudié ce transfert par l'utilisation du FACS et grâce à cette technique, nous avons aussi confirmé que ce transfert nécessitait un contact intercellulaire entre cellules cancéreuses et lymphocytes.

Après ces observations, il était intéressant d'étudier l'impact que pourrait avoir ce transfert sur la fonction des lymphocytes et leurs capacités cytotoxiques. En utilisant à nouveau le FACS avec un panel de différents marqueurs fonctionnels, nous ne sommes pas parvenus à conclure sur une influence quelconque du transfert de MG sur les lymphocytes. Il serait donc nécessaire d'approfondir nos connaissances et d'améliorer nos protocoles pour réitérer l'expérience.

En conclusion, ce travail contribue à une meilleure compréhension du rôle du stress MG en pathologie cancéreuse dans le contexte de l'épuisement immunitaire, nécessitant toutefois des recherches plus approfondies pour compléter les données préliminaires originales décrites ici.

## Abstract

Nowadays, it is well documented that cancer cells rely on a particular form of metabolism known as the “Warburg effect”, which includes aerobic glycolysis. One of the consequences of preferential use of the glycolysis pathway is the increased formation of a glycolysis by-product called methylglyoxal (MG). MG is a highly reactive molecule thanks to its powerful glycation capacity, since it can react with proteins, lipids and DNA to form advanced glycation products (AGEs). AGEs have an impact on cell function, causing glycation stress or MG stress. These AGEs are implicated in certain diseases, including cancer, for which the impact of MG has been demonstrated in several studies over the last ten years.

However, quite apart from its involvement in carcinogenesis, it has been demonstrated that myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are capable of transferring MG to T lymphocytes via intercellular contact. The transferred MG causes functional paralysis of these lymphocytes, which are well known to participate in anti-tumor immunity. Following this discovery, a question emerges: since cancer cells rely on glycolysis and consequently produce large quantities of MG, are they capable of transferring MG directly to lymphocytes? And what impact would this have?

To answer these questions, we first used cell imaging to attempt to observe this transfer of MG. Using different microscopes and labelling, we concluded that MG was being transferred from cancer cells to lymphocytes, but with no indication of cell-cell contact. We then studied this transfer using FACS and, thanks to this technique, we also confirmed that this transfer required intercellular contact between cancer cells and lymphocytes.

Following these observations, it was interesting to investigate the impact this transfer might have on lymphocyte function and cytotoxic capacity. Again, using FACS with a panel of different functional markers, we were unable to conclude on any influence of MG transfer on lymphocytes. It would therefore be necessary to deepen our knowledge and improve our protocols to repeat the experiment.

In conclusion, this work contributes to a better understanding of the role of MG stress in cancer pathology, in the context of immune exhaustion, requiring further research to complete the original preliminary data obtained here.

# Table des matières

I.	Introduction .....	1
I.1.	Le cancer du sein .....	1
I.1.1.	Épidémiologie .....	1
I.1.2.	Classification .....	1
I.1.3.	Pathologie .....	1
I.1.4.	Traitements .....	2
I.2.	Métabolisme dans le cancer .....	2
I.3.	Le méthylglyoxal (MG) : formation, détoxification, glycation et neutralisation .....	4
I.3.1.	Formation du MG .....	5
I.3.2.	Détoxification du MG .....	6
I.3.2.1.	Le système des glyoxalases .....	6
I.3.2.2.	Autres voies de détoxification du MG .....	7
I.3.3.	Glycation médiée par le MG .....	8
I.3.3.1.	Adduits protéiques .....	8
I.3.3.2.	Adduits de l'ADN .....	8
I.3.4.	Neutralisation du MG .....	9
I.3.4.1.	La carnosine .....	9
I.3.4.2.	L'aminoguanidine .....	9
I.3.4.3.	La metformine .....	10
I.4.	Le méthylglyoxal et le cancer .....	10
I.5.	Le microenvironnement tumoral .....	11
I.5.1.	Lymphocytes infiltrant la tumeur ou tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) .....	12
I.5.2.	Épuisement des lymphocytes T ou concept des « <i>exhausted T cells</i> » .....	13
I.6.	Transfert de méthylglyoxal .....	14
II.	Hypothèses, objectifs et stratégie expérimentale .....	16
III.	Matériel et méthodes .....	17
III.1.	Lignées et culture cellulaire .....	17
III.2.	Isolement de lymphocytes CD8+ .....	17
III.3.	Visualisation du transfert .....	18
III.3.1.	Marquages et cocultures .....	18
III.3.2.	Imagerie cellulaire .....	18
III.4.	Western Blot .....	18
III.4.1.	Extraction et dosage protéique .....	18
III.4.2.	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide .....	19
III.4.3.	Transfert sur membrane de PVDF .....	19
III.4.4.	Immunodétection et révélation .....	19

III.5.	Test de viabilité.....	20
III.6.	Test d'activité enzymatique .....	20
III.6.1.	Extraction et dosage protéique.....	20
III.6.2.	Mesure de l'activité enzymatique de GLO1 .....	21
III.7.	Cytométrie en flux .....	21
IV.	Résultats .....	23
IV.1.	Mise au point des conditions de coculture entre des lymphocytes et des cellules cancéreuses 23	
IV.1.1.	Choix du milieu pour la coculture des lymphocytes et des cellules cancéreuses .....	23
IV.1.2.	Choix du ratio et de la densité cellulaire pour la coculture des lymphocytes et des cellules cancéreuses .....	23
IV.1.2.1.	Choix du ratio cellulaire .....	23
IV.1.2.2.	Choix de la densité cellulaire.....	24
IV.1.3.	Vérification des fluorophores utilisés pour visualiser la coculture par imagerie cellulaire 24	
IV.2.	Première visualisation d'un transfert de méthylglyoxal entre des cellules cancéreuses et des lymphocytes : Incucyte® et Apotome .....	25
IV.2.1.	Visualisation de la coculture cellules cancéreuses-lymphocytes à l'aide de l'Apotome 25	
IV.2.1.	Visualisation de la coculture cellules cancéreuses-lymphocytes à l'aide de l'Incucyte® 25	
IV.3.	Confirmation de la visualisation du transfert de méthylglyoxal entre des cellules cancéreuses et des lymphocytes .....	26
IV.3.1.	Visualisation à l'aide du microscope confocal LSM980 .....	26
IV.3.2.	Visualisation à l'aide du Nanolive .....	26
IV.3.3.	Visualisation à l'aide du microscope confocal Spinning Disk.....	27
IV.4.	Utilisation du FACS pour étudier le transfert de méthylglyoxal entre des lymphocytes et des cellules cancéreuses .....	27
IV.4.1.	Stratégie de gating des lymphocytes et des cellules cancéreuses en coculture.....	28
IV.4.2.	Confirmation du transfert de méthylglyoxal entre des cellules cancéreuses et des lymphocytes grâce au FACS .....	28
IV.4.3.	Analyse du milieu de coculture conditionné par les cellules cancéreuses.....	30
IV.5.	Caractérisation des niveaux de base du MG stress et défenses anti-MG chez les lymphocytes et les cellules cancéreuses.....	31
IV.6.	Conséquences fonctionnelles du transfert de méthylglyoxal des cellules cancéreuses aux lymphocytes .....	32
IV.6.1.	Stratégie de marquage et de gating des lymphocytes .....	32
IV.6.2.	Étude des conséquences fonctionnelles du transfert de méthylglyoxal chez les lymphocytes .....	33
V.	Discussion .....	35
VI.	Conclusion et perspectives .....	41



VII.	Bibliographie.....	42
------	--------------------	----

# I. Introduction

## I.1. Le cancer du sein

### I.1.1. Épidémiologie

Le cancer du sein décrit des tumeurs malignes survenant au niveau des glandes mammaires. Ce cancer est le plus fréquent chez la femme et représente la première cause de décès liée aux cancers <sup>1</sup>. En effet, selon l'Organisation mondiale de la Santé, le cancer du sein a été diagnostiqué chez 2,3 millions de femmes dans le monde en 2022, causant plus de 670 000 décès.

### I.1.2. Classification

Le cancer du sein a été catégorisé dans les années 2000 selon la classification intrinsèque établie par Perou et Sorlie<sup>2</sup> basée sur le profil d'expression de gènes des différents sous-types du cancer du sein. Selon cette classification, il existe 4 sous-types de cancer du sein : 2 sous-types de cancer du sein exprimant des récepteurs hormonaux, le récepteur aux œstrogènes (ER) et le récepteur à la progestérone (PR) appelé Luminal A et Luminal B, le sous-type exprimant le récepteur au facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2) et le triple-négatif pour ces trois récepteurs <sup>3</sup>. Le cancer du sein positif aux récepteurs hormonaux est le plus fréquent et représente environ 70 % des cas. Le cancer du sein HER2+ représente 15 à 20 % des cas et le cancer du sein triple-négatif 10 à 15 % <sup>4</sup>, ce dernier étant une forme agressive et de mauvais pronostic <sup>5</sup>. En déterminant la présence ou l'absence de ces récepteurs, il est possible d'orienter les options thérapeutiques <sup>1</sup>.

### I.1.3. Pathologie

La plupart des cancers du sein sont des adénocarcinomes, en majorité provenant des canaux mammaires (85 %), mais on retrouve aussi des adénocarcinomes au niveau de l'épithélium lobulaire (15 %). Ces carcinomes peuvent aller du stade *in situ* vers un stade invasif qui peut envahir le parenchyme mammaire adjacent.

Les femmes atteintes d'un cancer du sein peuvent observer certaines anomalies :

- Masse au niveau mammaire ou axillaire
- Gonflement du sein ou changement de forme/taille
- Changements cutanés, écoulements ou rétraction mamelonnaire

Les risques de développer un cancer du sein peuvent être accrus par certains facteurs environnementaux tels que l'obésité, une consommation d'alcool élevée, un mode de vie sédentaire ou encore une exposition exogène à des hormones (pilule contraceptive ou traitement hormonal de substitution).

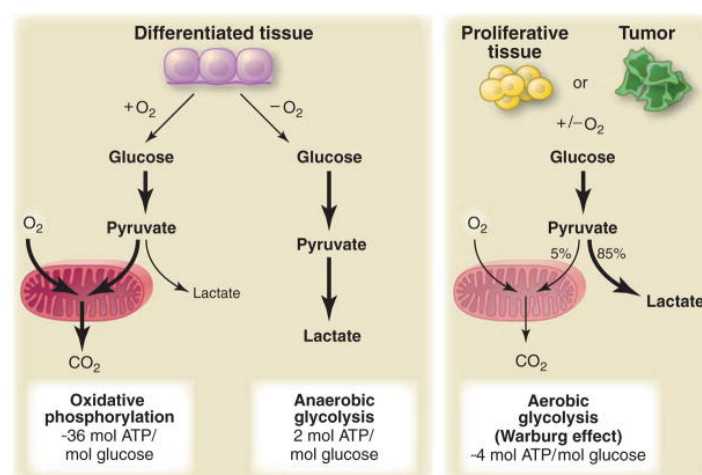
Certains facteurs sont quant à eux intrinsèques aux individus tels que les prédispositions génétiques, le vieillissement, ou une exposition endogène aux hormones <sup>1</sup>.

#### I.1.4. Traitements

Le traitement repose sur les conclusions du diagnostic, le sous-type de cancer du sein et le statut métastatique de la tumeur. Les différents types de traitements généralement envisagés sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, les thérapies ciblées (comme le trastuzumab et le pertuzumab) et les thérapies hormonales <sup>1</sup>. Plus récemment, l'immunothérapie, en particulier l'utilisation d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, s'est avérée révolutionnaire pour le traitement de certains types de cancer et notamment le cancer du sein triple-négatif pour lequel une combinaison avec la chimiothérapie s'est montrée prometteuse<sup>4</sup>.

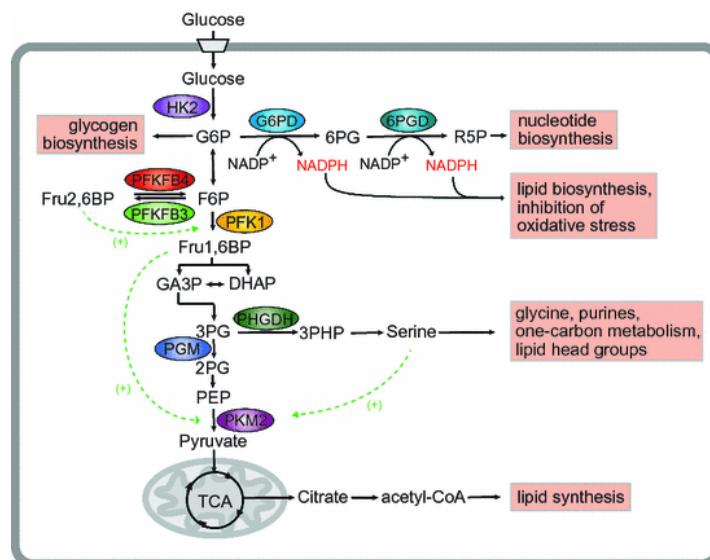
### I.2. Métabolisme dans le cancer

Les cellules nécessitent un apport constant en énergie pour maintenir leur survie et leur homéostasie ainsi que pour soutenir la division cellulaire. En conditions aérobies, les cellules différenciées métabolisent le glucose en pyruvate grâce à la glycolyse. Le pyruvate est ensuite dirigé vers les mitochondries pour être oxydé en  $\text{CO}_2$  par un processus appelé la phosphorylation oxydative qui mène à la production d'ATP. Ce processus génère 36 molécules d'ATP par oxydation complète d'une molécule de glucose avec une production minimale de lactate. En conditions limitées en oxygène, les cellules sont capables de détourner le pyruvate de cette phosphorylation oxydative pour générer du lactate via la glycolyse anaérobie. Ces réactions permettent de générer du  $\text{NAD}^+$  qui permettra à la glycolyse de se poursuivre alors que la production d'ATP est réduite à 2 molécules d'ATP par molécule de glucose (Figure 1) <sup>6</sup>.



**Figure 1 : Différences métaboliques entre les cellules différenciées et les cellules prolifératives, incluant les cellules cancéreuses.** En présence d'oxygène, les cellules différenciées utilisent principalement la phosphorylation oxydative qui oxyde complètement le glucose en  $\text{CO}_2$  pour produire un maximum d'ATP. En l'absence d'oxygène, elles réalisent la glycolyse anaérobie. En revanche, les cellules cancéreuses et prolifératives adoptent la glycolyse aérobie (effet Warburg), convertissant le glucose en lactate même en présence d'oxygène <sup>6</sup>.

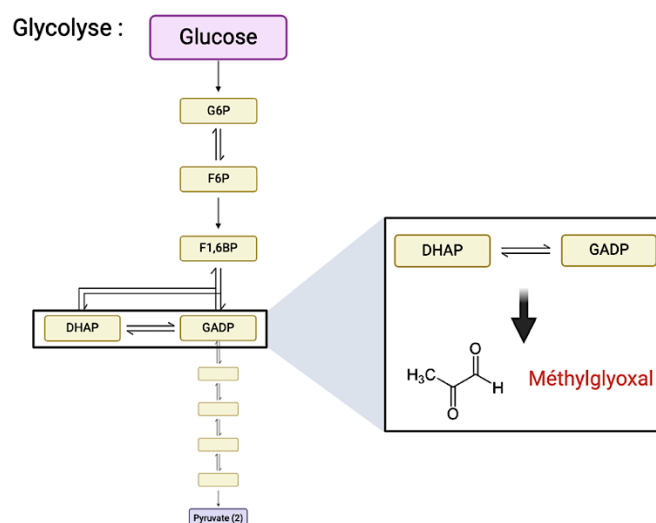
Les cellules cancéreuses, quant à elles, acquièrent des mutations génétiques qui modifient certaines voies de signalisation et ces voies sont alors capables d'activer l'absorption et le métabolisme de nutriments dans le but de favoriser leur survie et leur croissance <sup>6</sup>. Alors que les cellules normales reposent essentiellement sur la phosphorylation oxydative, les cellules cancéreuses utilisent une autre stratégie métabolique appelée glycolyse aérobie ou « effet Warburg ». En effet, Otto Warburg, prix Nobel de médecine, a remarqué que ces cellules ont tendance à convertir le glucose en lactate indépendamment de la présence/absence d'oxygène <sup>7</sup>. Cette adaptation métabolique génère environ 4 molécules d'ATP par molécule de glucose (Figure 1). Les chercheurs se sont donc demandé pourquoi cette voie restait prédominante alors qu'elle génère moins d'ATP que la phosphorylation oxydative. Au départ, cette modification métabolique a été interprétée comme un dysfonctionnement mitochondrial. Cependant, des recherches ultérieures ont démontré qu'il n'y avait pas d'altération mitochondriale suggérant que d'autres mécanismes motivent l'utilisation préférentielle de la glycolyse aérobie par les cellules cancéreuses <sup>6</sup>. L'une de ces raisons est que la glycolyse permet, en plus de produire de l'ATP, de générer des intermédiaires métaboliques qui peuvent être dirigés vers différentes voies anaboliques pour soutenir la synthèse de lipides, d'acides aminés et de nucléotides, indispensables à des cellules en prolifération <sup>7, 8</sup> (Figure 2).



**Figure 2 : Métabolisme du glucose dans le cancer.** Au niveau des cellules cancéreuses, le métabolisme du glucose alimente plusieurs voies biosynthétiques : la glycolyse, la voie des pentoses phosphates (qui mène à la biosynthèse de nucléotides et génère du NADPH pour la synthèse des lipides et des antioxydants), la biosynthèse du glycogène, la biosynthèse de la sérine (alimente la production de glycine, purines et groupements des têtes lipidiques ainsi que le métabolisme à un carbone) <sup>9</sup>.

### I.3. Le méthylglyoxal (MG) : formation, détoxification, glycation et neutralisation

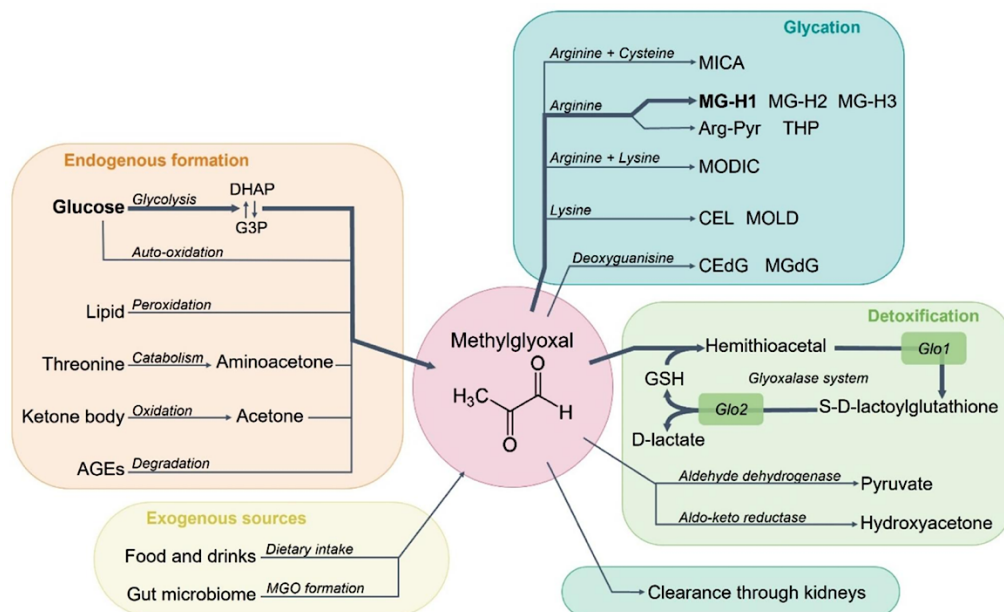
Une des conséquences obligées de l'utilisation élevée de la glycolyse est la formation accrue d'un intermédiaire glycolytique appelé le méthylglyoxal (MG). En effet, au cours de la glycolyse, le glucose est transformé successivement en glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P) et fructose-1,6-biphosphate (F1,6BP). Ce dernier est clivé en deux trioses phosphates, le glycéraldéhyde-3-phosphate (GADP) et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et ces deux isomères peuvent subir différentes réactions non enzymatiques de dégradation qui génèrent in fine le MG. Ainsi, l'augmentation de la glycolyse observée dans les cellules cancéreuses aboutit à une production excessive de MG <sup>10</sup> (Figure 3).



**Figure 3 : Formation du méthylglyoxal (MG) à partir d'intermédiaires de la glycolyse.** Les trioses phosphates, le glycéraldéhyde-3-phosphate (GADP) et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP), peuvent être dégradés non enzymatiquement, menant à la formation de méthylglyoxal. Glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P), fructose-1,6-biphosphate (F1,6BP). Schéma réalisé avec BioRender.

Le MG est une molécule dicarboxylée de 72 Da qui se compose d'un groupement cétone et d'un groupement aldéhyde (Figure 3). Ce sous-produit hautement réactif est considéré comme un agent de glycation très puissant notamment grâce au groupement aldéhyde <sup>11</sup>. En effet, à l'instar d'un sucre réducteur, le MG est impliqué dans des réactions non enzymatiques de glycation dans lesquelles il peut réagir spontanément avec les protéines, l'ADN et les lipides. Les produits finaux de ces réactions de glycation sont appelés produits de glycation avancée (*Advanced Glycation End Products*, AGEs) ou adduits du MG. Ces AGEs altèrent non seulement la structure, mais aussi la fonction des macromolécules concernées, ce qui peut perturber leur activité biologique et provoquer un stress glycant ou un stress du MG <sup>10</sup>. De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de ces AGEs dans le diabète ou le cancer mais aussi dans certaines maladies cardiovasculaires et neurodégénératives <sup>12</sup>. Ce

stress glycant est causé par un déséquilibre entre la formation/accumulation et la détoxification de ce composé, augmentant les réactions de glycation à l'origine des dysfonctionnements cellulaires associés à ces pathologies <sup>13</sup>. Les AGEs sont également capables d'interagir avec des récepteurs spécifiques appelés RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*), déclenchant des voies de signalisation stimulantes pour la survie, la prolifération et l'invasion des cellules tumorales. Ces mécanismes entravent les voies apoptotiques, conférant aux cellules cancéreuses une résistance accrue à l'apoptose, un élément déterminant de leur agressivité et de leur résistance aux traitements <sup>14</sup>.



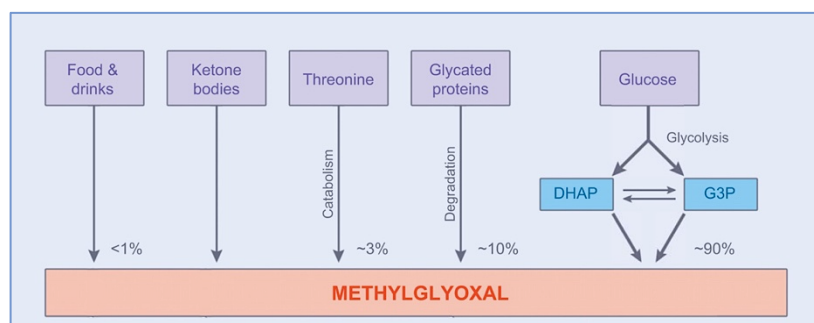
**Figure 4 : Schéma résumant les voies de formation, et de détoxification du MG et les réactions de glycation.** Schéma réalisé par <sup>15</sup>.

### I.3.1. Formation du MG

Le MG peut être formé de manière endogène par différentes voies. Comme mentionné plus tôt, le MG est produit de manière prédominante à partir de la glycolyse et de la dégradation spontanée des isomères, GADP et DHAP <sup>16</sup>. En effet, la glycolyse serait responsable de 90% de la formation endogène de MG <sup>17</sup>. À côté de cela, le MG peut être produit par d'autres voies comme l'auto-oxydation du glucose<sup>18</sup>, la peroxydation des lipides <sup>19</sup>, l'oxydation de l'acétoacétone issue du catabolisme de la thréonine par la semicarbazide-sensible amine oxydase (SSAO) <sup>20</sup> ou encore l'oxydation de l'acétone issu du catabolisme des corps cétoniques par l'acétol mono-oxygénase (AMOO)<sup>12, 21</sup>. Le MG peut également être produit lors de la dégradation enzymatique de protéines ayant subi une glycation <sup>18</sup> (Figure 5).

Par ailleurs, la production endogène ne constitue pas la seule source de MG pour les cellules. En effet, certains aliments que nous consommons dans la vie quotidienne tels que le café, les noix, le poisson ou la viande contiennent du MG <sup>22</sup>. De plus, certaines souches de bactéries présentes dans le microbiote

intestinal expriment une enzyme qui leur est propre, la MG synthase, capable de produire du MG <sup>23,24</sup>. Cependant, ces deux sources resteraient des apports mineurs en comparaison avec les sources endogènes<sup>15</sup>.



**Figure 5 : Contribution des différentes voies à la formation du méthylglyoxal (MG).** Le MG est principalement produit à partir de la glycolyse, mais peut aussi être formé par l'oxydation du glucose, des lipides, du catabolisme de la thréonine ou des corps cétoniques et de la dégradation de protéines glyquées <sup>17</sup>.

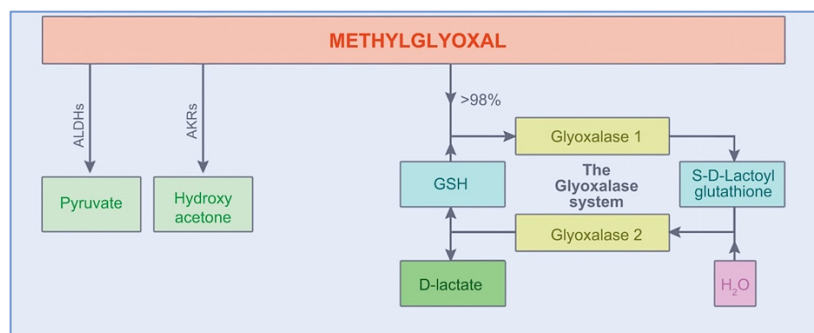
Il est important de souligner que tous ces précurseurs sont des molécules abondantes associées à différentes voies métaboliques mais l'abondance de MG et son taux de formation dépendent fortement de l'activité métabolique de la cellule, de l'organisme ou du tissu étudié ainsi que des conditions physiologiques <sup>12</sup>. Cependant, on estime que les concentrations intracellulaires de MG se situent entre 1 et 4  $\mu\text{M}$  <sup>25</sup>. En raison de sa forte réactivité, il est probable que sa demi-vie biologique soit relativement courte, ce qui suggère que la quantité réellement produite ne correspond pas à la concentration intracellulaire mesurée dans les cellules <sup>12</sup>.

### I.3.2. Détoxification du MG

Au vu de son abondance, de sa réactivité ainsi que des effets néfastes que le MG peut engendrer sur les fonctions cellulaires, les cellules ont mis en place des systèmes de détoxification du MG pour tenter de limiter ses dommages <sup>12</sup>.

#### I.3.2.1. Le système des glyoxalases

Le système des glyoxalases a été découvert il y a plus de cent ans et existe en réalité dans toutes les cellules de mammifères <sup>26</sup>. Ce système se compose de deux enzymes : la glyoxalase 1 (GLO1) et la glyoxalase 2 (GLO2) qui coopèrent pour transformer le MG en D-lactate par l'intermédiaire du S-D-lactoylglutathion <sup>27</sup>.



**Figure 6 : Voies de détoxification du MG.** Le MG est principalement détoxifié en D-lactate grâce au système des glyoxalases. Les aldéhydes déshydrogénases (ALDHs) et les aldo-kéto réductases (AKRs) sont également capables de le détoxifier en pyruvate et en hydroxyacétone, respectivement <sup>17</sup>.

La première étape de cette transformation est la formation spontanée d'un hémithioacétal à partir du MG en présence de glutathion réduit (GSH). Ensuite, GLO1 prend en charge cet hémithioacétal et catalyse sa conversion en S-D-lactoylglutathion. Pour finir, GLO2 hydrolyse le S-D-lactoylglutathion en D-lactate tout en reformant du GSH indispensable au recommencement de ce cycle <sup>27</sup> (Figure 6). GLO1 constitue l'étape limitante de la détoxification du MG, elle est donc essentielle pour réguler la concentration de cette molécule à un niveau faible pour maintenir les conditions physiologiques <sup>26</sup>. Il n'est donc pas surprenant que les cellules cancéreuses surexpriment cette enzyme pour favoriser leur survie sans atteindre des niveaux toxiques de MG <sup>28</sup>. L'activité de GLO1 peut être régulée au niveau de son expression ou par des modifications post-traductionnelles. Parmi ces dernières, figurent la phosphorylation, les modifications médiées par le monoxyde d'azote (NO) ainsi que la glutathionylation<sup>10</sup>.

#### *1.3.2.2. Autres voies de détoxification du MG*

Les glyoxalases ne sont pas les seules à pouvoir détoxifier le MG. En effet, des enzymes de la famille des aldéhyde déshydrogénases (ALDHs) et des aldo-kéto réductases (AKRs) sont également impliquées dans des voies alternatives de détoxification du MG <sup>10</sup>. Ces deux familles d'enzymes sont capables de convertir le MG en composés non toxiques pour la cellule (Figure 6).

Les ALDHs catalysent l'oxydation du MG en pyruvate, de manière dépendante au NADPH ou NADH. Plusieurs isoformes de cette enzyme existent comme les ALDH1, ALDH2 ou ALDH3 pour détoxifier les différents aldéhydes dont le MG. Cependant, le MG, en comparaison avec les autres aldéhydes, est un moins bon substrat pour ces enzymes en raison de son hydratation complète à pH physiologique alors que les autres aldéhydes sont seulement partiellement hydratés. La détoxification par les ALDHs n'en reste pas moins une voie complémentaire à celle des glyoxalases <sup>29</sup>.

Les AKRs, quant à elles, détoxifient le MG en catalysant sa réduction en hydroxyacétone avec le NADPH comme cofacteur <sup>29</sup>. Les AKRs présenteraient une meilleure sélectivité envers le MG par rapport aux ALDHs <sup>12</sup>. Il en existe différentes isoformes comme AKR1B1, AKR1B3 ou encore

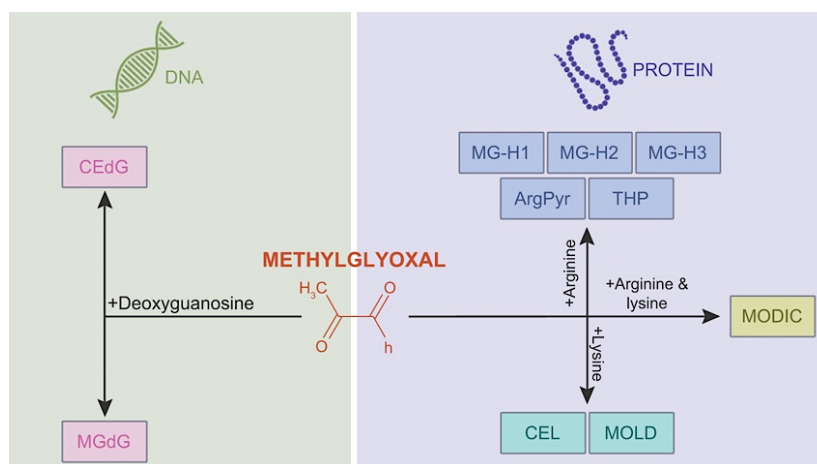


AKR1B10<sup>30</sup>. Une étude a montré qu'en cas de déficit en GLO1, l'activité de l'enzyme AKR1B3 se voit augmentée pour compenser cette perte dans les cellules de Schwann chez les mammifères<sup>31</sup>.

Cependant, il reste difficile d'estimer la contribution de ces deux voies dans la détoxification du MG étant donné que l'expression et l'activité de ces enzymes sont différentes en fonction des tissus<sup>31</sup>.

### I.3.3. Glycation méditée par le MG

Le MG est une molécule hautement réactive et, grâce à ses propriétés électrophiles, il peut réagir avec des groupements nucléophiles sur de nombreuses macromolécules, formant ainsi des adduits covalents. Les deux cibles principales de ces glycations sont les protéines et l'ADN<sup>12</sup>.



**Figure 7 : Adduits de glycation du MG.** Le MG réagit avec les résidus arginine ou lysine des protéines et la déoxyguanosine de l'ADN pour former des adduits ou produits de glycation avancée (AGEs)<sup>17</sup>.

#### I.3.3.1. Adduits protéiques

Les réactions du MG avec les protéines se produisent majoritairement avec l'arginine mais aussi avec la lysine : des acides aminés basiques dont la chaîne latérale est riche en groupements azotés chargés positivement à pH physiologique<sup>32</sup>. Le MG réagit avec les résidus arginine pour former des dérivés hydroimidazolones appelés MG-Hs comme les MG-H1, MG-H2 et MG-H3<sup>33</sup> (Figure 7). En plus des MG-Hs, le MG peut aussi interagir avec l'arginine pour former les argpyrimidines (ArgPyr)<sup>34</sup> ou encore les tétrahydropyrimidines (THP)<sup>35</sup>. Dans une moindre mesure, le MG peut réagir avec les résidus lysine pour former la Nε-(1-carboxyethyl) lysine (CEL)<sup>36</sup> et former des dimères lysine-lysine appelés MOLD<sup>37</sup>. Le MG peut aussi réagir avec un résidu lysine et un résidu arginine pour former les adduits appelés MODIC<sup>38</sup> (Figure 7). Ces modifications impactent la structure ainsi que la fonction des protéines entravant potentiellement le fonctionnement cellulaire<sup>12</sup>.

#### I.3.3.2. Adduits de l'ADN

La cible principale du MG au niveau de l'ADN est la déoxyguanosine (dG)<sup>39</sup>. La liaison du MG au niveau de la dG forme deux adduits : le N2-carboxyethyl-2'-déoxyguanosine (CE dG) et le 3-(2'-déoxyribo-5-phosphoryl)-6,7-dihydro-6,7-dihydroxy-6,7-méthylimidazo-[2,3-b]purin-9(8)one (MG dG)<sup>40</sup> (Figure

7). La glycation de l'ADN par le MG peut entraîner des cassures des brins d'ADN, des transversions de nucléotides ou des formations de liaisons covalentes ADN-ADN/protéine par exemple <sup>10</sup>, participant à l'instabilité génomique, impactant la transcription et à l'apparition de mutations. Pour empêcher cela, les cellules disposent de systèmes de réparation de l'ADN comme la réparation des mésappariements (MMR), la réparation par excision des bases (BER) ou la réparation par excision des nucléotides (NER). Si les cellules ne sont pas en mesure de réparer efficacement ces lésions, ces dommages persistent et peuvent entraîner une instabilité génomique ainsi que l'apparition de mutations <sup>12</sup>.

#### I.3.4. Neutralisation du MG

Pour tenter de limiter les effets physiopathologiques liés au stress MG, certaines molécules, appelées aussi *scavengers*, peuvent être utilisées comme nouvelles approches thérapeutiques pour neutraliser le MG et empêcher la formation d'adduits de glycation <sup>17</sup>.

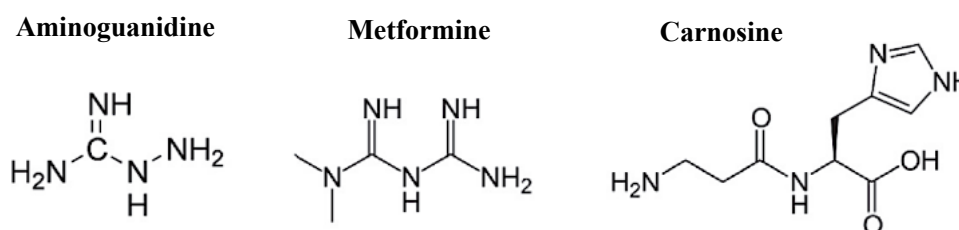


Figure 8 : Structure chimique de différents scavengers du MG <sup>41</sup>.

##### I.3.4.1. La carnosine

La carnosine est un dipeptide β-alanyl-L-histidine synthétisé de manière naturelle dans la plupart des organismes eucaryotes en particulier dans les tissus musculaires et nerveux. Elle possède des propriétés antioxydantes et antiglycation qui permettent d'empêcher la formation d'adduits et ainsi de protéger les cellules. En pratique, la carnosine réagit directement avec le MG grâce à son groupe amine (provenant de la β-alanine) et son noyau imidazole (provenant de l'histidine) empêchant alors le MG de réagir avec ses cibles de glycation et prévenant la formation d'adduits néfastes pour la cellule <sup>42</sup> (Figure 8). Cette molécule pourrait être un agent intéressant pour lutter contre les maladies pour lesquelles les AGEs jouent un rôle dans la pathogenèse. En effet, l'efficacité pharmacologique de la carnosine a été mise en évidence entre autres dans des modèles murins de maladies cardiovasculaires <sup>17</sup>.

##### I.3.4.2. L'aminoguanidine

L'aminoguanidine est également un des scavengers du MG et permet d'empêcher la formation d'AGEs. Elle se compose de deux groupements fonctionnels, un groupe hydrazine nucléophile et un groupe guanidine, qui ensemble peuvent piéger les molécules dicarboxylées réactives comme le MG (Figure 8). L'aminoguanidine mime l'interaction du MG avec des protéines et piège le MG pour

l'empêcher de réagir une fois de plus avec ses cibles de glycation <sup>43</sup>. Par exemple, l'aminoguanidine s'est montrée efficace à réduire le niveau des AGEs dans des modèles murins de diabète, et a permis de diminuer les complications fréquentes et graves de ce dernier telles que la néphropathie ou la rétinopathie <sup>17</sup>.

#### *I.3.4.3. La metformine*

La metformine est l'antidiabétique oral le plus couramment prescrit pour traiter le diabète de type 2, en agissant principalement par inhibition de la gluconéogenèse hépatique et en favorisant la captation du glucose par les cellules. Il s'avère que la metformine présente une structure similaire à l'aminoguanidine et est capable de réagir avec le MG comme les autres scavengers (Figure 8) <sup>17</sup>. Il a été démontré qu'elle permet de réduire les niveaux plasmatiques de MG chez les patients atteints de diabète de type 2 <sup>44</sup>. En plus de son activité de scavenger et de l'amélioration du contrôle glycémique, la metformine augmente l'activité de GLO1 dans les lésions athérosclérotiques, ce qui pourrait également jouer un rôle dans la réduction du taux circulant de MG <sup>45</sup>. Ainsi, la neutralisation du MG hautement réactif par la metformine pourrait représenter un mécanisme complémentaire expliquant son efficacité dans la prévention des complications vasculaires liées au diabète <sup>17</sup>.

### *I.4. Le méthylglyoxal et le cancer*

Comme évoqué précédemment, le MG est impliqué dans diverses pathologies, notamment le cancer. Des travaux menés par l'équipe du Professeur A. Bellahcène ont contribué à mettre en évidence son rôle dans divers aspects de la cancérogenèse et certaines de ces études seront discutées dans cette section.

Tout d'abord, une étude dans le cancer du pancréas a permis de relier la résistance à la gemcitabine au stress MG. La gemcitabine agit principalement en inhibant la synthèse de l'ADN, aboutissant à l'apoptose des cellules traitées. Un lien entre le MG et la régulation des voies HSR (*heat shock response*) serait la cause de cette résistance à la gemcitabine. La voie HSR est une voie cellulaire qui se déclenche pour réagir face à un stress protéotoxique ou à des hautes températures dans le but de préserver le protéome. Dans cette voie, on retrouve des protéines de choc thermique appelées HSP (*heat shock protein*) comme HSP90 ou HSP27, et ces protéines sont des chaperons moléculaires qui veillent au bon repliement des protéines. Lorsque la voie HSR est activée, le facteur de transcription HSF1 augmente leur expression. Le stress glycant provoqué par le MG entraîne une augmentation de l'activité de HSF1 qui augmente l'expression des HSPs pour faire face à ce stress. Par ailleurs, HSP27 est une cible de glycation du MG et il s'avère que sa version glyquée serait plus active que sa version non modifiée <sup>46</sup>. Tous ces éléments permettent alors aux cellules tumorales d'échapper à l'apoptose que pourrait causer ce stress protéique. Le MG pourrait alors promouvoir la survie cellulaire via l'activation de la voie HSR, renforçant ainsi sa résistance aux traitements <sup>47</sup>.

Dans une seconde étude en relation avec les protéines HSPs, il a été observé qu'un lien existait entre le MG et la voie de signalisation Hippo au niveau du cancer du sein. En effet, HSP90 a été découverte comme une cible de glycation du MG, et la glycation de cette protéine a affecté ses propriétés de chaperonne. En théorie, cette chaperonne est capable de configurer la kinase LATS1, qui elle-même, en phosphorylant le co-activateur transcriptionnel YAP, entraîne la dégradation de cet activateur. C'est grâce à cette dégradation, perçue comme un signal anti-prolifératif, que la croissance cellulaire est régulée par la voie Hippo. Le MG affectant HSP90, LATS1 n'est pas stabilisée compromettant ainsi son activité et entraînant une accumulation nucléaire de YAP qui va déclencher l'expression de facteurs de croissance qui favorisent la prolifération tumorale <sup>48</sup>.

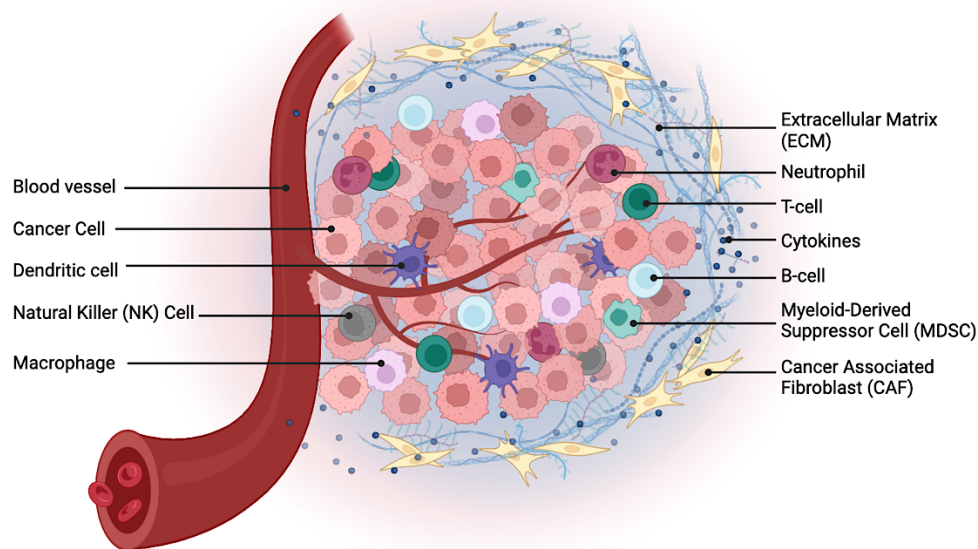
Une troisième étude s'est plutôt intéressée à l'impact du MG sur la capacité métastatique des cellules cancéreuses mammaires. Une signature pro-métastatique a été mise en relation avec le stress MG. En amont des gènes constituant cette signature, les auteurs ont mis en évidence une hyperactivation de la voie MEK/ERK/SMAD1 qui se produit notamment à la faveur de la diminution de l'expression de phosphatases à double spécificité sous stress MG. L'activation de cette voie entraîne l'expression de certains composants de la matrice extracellulaire, comme les collagènes et la ténascine C par exemple, favorisant ainsi le remodelage de la matrice et la migration cellulaire et par conséquent le processus métastatique <sup>49</sup>.

## I.5. Le microenvironnement tumoral

Le cancer est une maladie qui résulte d'une accumulation progressive de mutations au niveau des cellules normales qui se transforment en cellules tumorales. Ces dernières ont été la cible logique des recherches entreprises pour tenter d'élucider le processus complexe menant de l'initiation au développement des tumeurs malignes et de leurs métastases. Très rapidement, il a été observé que les cellules non cancéreuses constituant la tumeur pouvaient jouer un rôle essentiel au cours de la cancérogenèse. À l'heure actuelle, le cancer est perçu comme un processus évolutif et complexe, où des interactions constantes et réciproques se produisent entre les cellules tumorales et les cellules non tumorales. L'ensemble de ces données a conduit à l'émergence du concept de microenvironnement tumoral (TME pour *Tumor microenvironment*) <sup>50</sup>.

Le TME constitue une niche à la fois fonctionnelle et structurale, propice au développement tumoral <sup>51</sup>. Il est assez complexe et hétérogène et les interactions entre tous ses composants favorisent la croissance tumorale, l'invasion, l'angiogenèse et les métastases <sup>52</sup>. Le TME se compose d'acteurs cellulaires tels que les fibroblastes (*cancer-associated fibroblasts* ou CAFs), les cellules endothéliales, les adipocytes, ainsi que les cellules immunitaires de l'immunité innée et adaptative. Il inclut également des composants non cellulaires, comme la matrice extracellulaire et des éléments solubles tels que les cytokines, les chimiokines, les facteurs de croissance ou encore les vésicules extracellulaires <sup>50</sup> (Figure 9). Il est

largement admis que tant la composition que l'organisation du microenvironnement tumoral varient non seulement en fonction du type de cancer considéré mais aussi d'une tumeur à l'autre <sup>53</sup>.



**Figure 9 : Représentation schématique du microenvironnement tumoral.** Les tumeurs sont notamment composées de cellules stromales, immunitaires (innée et adaptative) et de composants non cellulaires formant la matrice extracellulaire (ECM). Template réalisé sur BioRender, d'après <sup>54</sup>.

La composante immunitaire de cet environnement comprend entre autres des lymphocytes T, des lymphocytes B, des cellules NK, des cellules dendritiques, des macrophages associés à la tumeur (*tumor-associated macrophages* ou TAM), des neutrophiles associés à la tumeur (*tumor-associated neutrophils* ou TAN), des cellules myéloïdes suppressives (*myeloid-derived suppressor cells*, ou MDSCs) <sup>51</sup> (Figure 9). Dans le cadre de mon projet, nous nous intéresserons surtout aux lymphocytes.

### I.5.1. Lymphocytes infiltrant la tumeur ou tumor-infiltrating lymphocytes (TILs)

Les cellules immunitaires jouent un rôle central dans le microenvironnement tumoral. Selon le stade du développement tumoral, le type de cellules immunitaires et la complexité de cet environnement, elles peuvent exercer une action anti-tumorale ou, au contraire, contribuer à la progression du cancer. L'inflammation chronique présente sur le site tumoral favorise l'activation des cellules immunitaires, qu'elles soient résidentes ou circulantes, entraînant leur accumulation autour de la tumeur. Par ailleurs, les composants du TME, notamment les cellules stromales, libèrent diverses chimiokines et cytokines qui facilitent le recrutement de cellules immunitaires issues à la fois de l'immunité innée et adaptative. Parmi ces cellules, les lymphocytes T représentent l'un des acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative dirigée contre la tumeur <sup>55</sup>.

En 1975, le microenvironnement immunitaire tumoral est caractérisé par l'identification des lymphocytes infiltrant la tumeur (*tumor-infiltrating lymphocytes* ou TILs en anglais) <sup>56</sup>. Les TILs sont définis comme des cellules immunitaires mononucléées présentes au sein du tissu tumoral et ont été documentés dans la plupart des tumeurs solides, y compris le cancer du sein <sup>57</sup>. Les TILs regroupent différents types de lymphocytes en terme de phénotype mais aussi de fonction biologique, on y retrouve notamment : les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, les cellules T CD8<sup>+</sup> à mémoire, les cellules T CD4<sup>+</sup> helper de type 1/2/17 (Th1, Th2, Th17), les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices (couramment appelées Treg), les cellules T CD4<sup>+</sup> helper folliculaires (Tfh) et les cellules B infiltrant la tumeur <sup>4</sup>. Comme mentionné ci-dessus, certains d'entre eux favorisent la tumorigenèse et d'autres la limitent.

D'une part, les cellules T CD8<sup>+</sup>, qui sont les acteurs majeurs de la réponse anti-tumorale, sont capables de tuer les cellules tumorales en reconnaissant des antigènes tumoraux et en sécrétant de l'IFN $\gamma$  et le complexe granzyme/perforine <sup>58</sup>. Elles peuvent être aidées et stimulées par les cellules T CD4<sup>+</sup> Th1 qui libèrent de l'IFN $\gamma$ , du TGF- $\beta$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-2 mais ces Th1 peuvent aussi activer certains macrophages anti-tumoraux <sup>58,59</sup> ou encore des cellules NK <sup>60</sup>. Les Th1 sont aussi capables de moduler la capacité de présentation d'antigènes par les cellules dendritiques influençant ainsi indirectement la réponse des cellules T cytotoxiques <sup>60</sup>. Les cellules B, quant à elles, participent à l'immunité anti-tumorale grâce à la production d'anticorps spécifiques des antigènes tumoraux <sup>60</sup>.

D'autre part, les cellules T CD4<sup>+</sup> Th2 produisent des facteurs comme l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 ou IL-13 capables d'augmenter l'activité pro-tumorale de certains macrophages <sup>59</sup>. Les cellules T CD4<sup>+</sup> Th17 participent également à l'immunité pro-tumorale puisqu'elles favorisent la croissance de la tumeur en instaurant un environnement inflammatoire via la production d'IL-17a, IL-17f, IL-21, IL-22 <sup>53</sup>. Les Th17 ont aussi la capacité d'induire l'angiogenèse en produisant de l'IL-17 qui induit l'expression de facteurs pro-angiogéniques chez les cellules tumorales, endothéliales ou stromales <sup>60</sup>. Les Treg sont des cellules impliquées dans les mécanismes d'échappement immunitaire puisqu'elles peuvent inhiber la prolifération des cellules Th1 en sécrétant de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  <sup>61</sup>.

En ce qui concerne le cancer du sein, le sous-type dit triple négatif est considéré comme étant le plus immunogénique car il présente un niveau élevé de TILs <sup>62</sup>. Il a été démontré dans diverses études qu'un niveau élevé de TILs au niveau de ce type de cancer était corrélé à un meilleur pronostic <sup>63</sup> et à une meilleure réponse vis-à-vis des thérapies néoadjuvantes <sup>64</sup>.

### I.5.2. Épuisement des lymphocytes T ou concept des « *exhausted T cells* »

Malgré le fait qu'une tumeur puisse être infiltrée par des TILs, ces derniers peuvent perdre leurs propriétés fonctionnelles et devenir ce qu'on appelle des « *exhausted T cells* ». En effet, lorsque les lymphocytes sont exposés de façon chronique aux antigènes, comme dans le contexte d'un cancer, leur activation et leur différenciation peuvent être altérées menant à l'épuisement fonctionnel de ces cellules T <sup>65</sup>. Ce phénomène a d'abord été découvert dans le contexte d'infections virales, lorsque ces cellules

immunitaires persistaient mais ne parvenaient plus à éliminer le pathogène, avant d'être observé dans le cancer <sup>66</sup>. Ce concept englobe des états dysfonctionnels comme une perte de prolifération ou des capacités effectrices, des changements métaboliques, une production diminuée de cytokines ou encore une augmentation de l'expression de certains récepteurs inhibiteurs comme PD-1 <sup>67</sup>.

L'état d'épuisement n'est pas un état fixe et apparait de façon progressive. Par exemple, la perte des capacités effectrices se fait de manière progressive et selon une certaine hiérarchie. En effet, il apparait que la perte de production d'IL-2 soit suivie de celle de TNF à des stades plus précoces d'épuisement, alors que la perte de production d'IFN $\gamma$  apparait à un stade plus avancé de cet épuisement <sup>68</sup>.

Une des caractéristiques des lymphocytes est qu'ils sont capables d'adapter leur métabolisme en fonction de leur état d'activation. En effet, lors d'une infection aigue, les lymphocytes sont activés via le signal médié par le TCR qui induit l'activation des voies de signalisation en aval. Ces activations entraînent le passage d'un métabolisme quiescent qui repose sur la phosphorylation oxydative vers un profil activé qui repose sur la glycolyse, avant le retour vers la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras pour le développement de cellules mémoires <sup>69</sup>. Dans une étude faite *in vitro*, la liaison à des récepteurs inhibiteurs comme PD-1 a eu pour conséquence de réguler négativement la glycolyse<sup>70</sup>. Un même effet a été observé *in vivo* avec une restriction de l'absorption et d'utilisation du glucose ainsi qu'une altération du métabolisme mitochondrial au niveau des lymphocytes <sup>71</sup>.

Cependant, PD-1 n'est pas le seul récepteur inhibiteur exprimé par les lymphocytes. Ces dernières années, d'autres récepteurs, comme CTLA-4, TIM-3 ou LAG-3, ont été découverts et sont eux aussi responsables d'une suppression d'activation et de fonction des cellules T. Lors d'une infection aigue, ces récepteurs sont en réalité exprimés transitoirement afin de réguler la réponse immunitaire pour éviter de potentielles dérives vers des pathologies immunitaires ou des problèmes d'auto-immunité, par exemple. Cette expression diminue au fur et à mesure que l'antigène causal est éliminé. Dans le cadre du cancer, les récepteurs inhibiteurs sont hautement exprimés et leur expression est maintenue bien après l'activation. Les cellules T épuisées coexpriment généralement plusieurs d'entre eux et l'étendue de cette coexpression marque généralement la sévérité de l'épuisement <sup>68</sup>.

Tous ces éléments expliquent l'émergence des bloqueurs de récepteurs inhibiteurs dans le domaine de l'immunothérapie avec pour but d'inverser les effets de cet épuisement et de rétablir une immunité anti-tumorale pour contrer la progression tumorale <sup>68</sup>.

## I.6. Transfert de méthylglyoxal

Une étude publiée en 2020 par Baumann et al. s'est intéressée plus précisément aux MDSCs <sup>72</sup>. Ces cellules apparaissent en cas d'inflammation chronique, notamment dans le contexte du cancer.

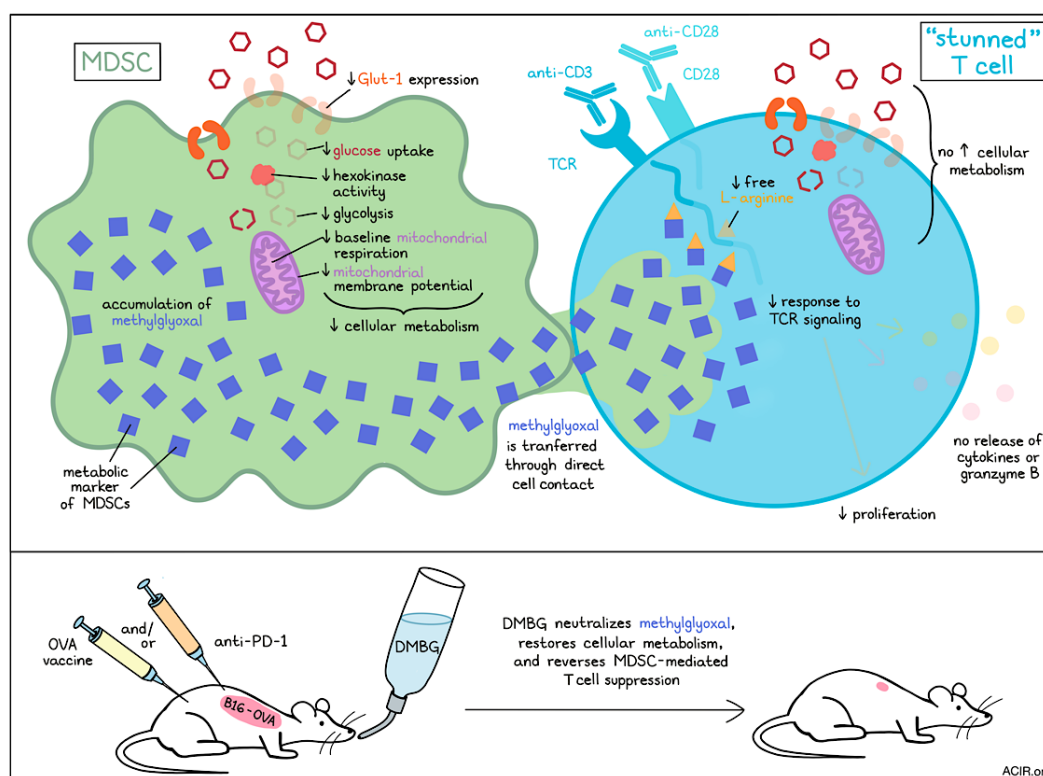
Dans cette étude, les chercheurs ont d'abord mis en évidence que les MDSCs présentent un phénotype suppressif caractérisé par un métabolisme dormant, une caractéristique que nous savons directement liée



à l'activité de glycation du MG. Ils ont ensuite démontré que les MDSCs sont capables de transférer du MG à des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par contact intercellulaire, entraînant une paralysie fonctionnelle de ces derniers. Plus précisément, ce transfert de MG a supprimé la signalisation médiée par le TCR en inactivant les kinases en aval, n'entraînant pas d'augmentation de l'absorption de glucose, ni de la glycolyse, ce qui a réduit les niveaux d'ATP. Ces perturbations métaboliques entraînent une inactivation des lymphocytes T, empêchant ainsi l'expression des cytokines TNF et IFN $\gamma$ , ainsi que la sécrétion de granzyme B, toutes essentielles à leurs fonctions effectrices.

Ces auteurs <sup>72</sup> révèlent que toutes ces modifications sont en fait causées par la réactivité du MG avec l'arginine, un acide aminé important pour l'activation des lymphocytes T. Le MG peut réagir avec la L-arginine pour former des AGEs comme les MG-H et les argpyrimidines, avec pour conséquence une réduction des niveaux d'arginine libre disponible pour le bon fonctionnement du lymphocyte.

En utilisant le DMBG (diméthylbiguanide), autre nom pour la metformine, ils sont parvenus à inverser le phénotype suppressif des MDSCs et à restaurer le métabolisme et l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Figure 10).



**Figure 10 : Le transfert intercellulaire de méthylglyoxal et ses conséquences.** Panel du haut : Les cellules MDSC transfèrent du méthylglyoxal (MG) aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, ce qui inhibe la signalisation du TCR, altère leur métabolisme et empêche l'expression de TNF, d'IFN $\gamma$  et de granzyme B. Panel du bas : La neutralisation du MG par une molécule scavenger, telle que le DMBG, restaure la fonction des lymphocytes T. <sup>72, 73</sup>



## II. Hypothèses, objectifs et stratégie expérimentale

Sur base du transfert de MG rapporté entre des cellules immunitaires <sup>72</sup>, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle un tel transfert serait possible directement depuis une cellule cancéreuse vers des lymphocytes T comme une nouvelle stratégie d'immunosuppression exercée au niveau des tumeurs. L'objectif de mon mémoire est de déterminer si une cellule cancéreuse est capable de transférer du MG à des lymphocytes T et, dans un second temps, d'évaluer l'impact de ce stress glycant au niveau de ces lymphocytes. Afin de répondre à ces objectifs, nous utiliserons des cellules cancéreuses mammaires issues soit de lignée humaine (MDA-MB-231) soit de lignée murine (4T1). Ces cellules seront mises en coculture, respectivement, avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de la lignée humaine Jurkat ou des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> isolés à partir de rates de souris porteuses d'une tumeur. Chaque population cellulaire sera marquée pour pouvoir, d'une part, différencier les cellules en coculture et, d'autre part, pour visualiser le transfert de méthylglyoxal de l'une à l'autre. À cet effet, différents outils d'imagerie cellulaire seront utilisés. Enfin, nous caractériserons l'impact du stress glycant grâce aux techniques de cytométrie en flux, et de Western blot avec le support de résultats de calculs d'IC<sub>50</sub> ou encore de mesure d'activité enzymatique.

### III. Matériel et méthodes

#### III.1. Lignées et culture cellulaire

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées dans le cadre de ce projet : pour les lignées cancéreuses nous avons utilisé les MDA-MB-231 et les 4T1 et pour la lignée lymphocytaire nous avons utilisé les Jurkat. Les MDA-MB-231 sont des cellules cancéreuses mammaires humaines qui ont été isolées à partir d'un épanchement pleural réalisé sur une femme de 51 ans atteinte d'un adénocarcinome mammaire métastatique de type triple-négatif <sup>74, 75</sup>. Les 4T1 sont des cellules cancéreuses mammaires murines isolées d'une tumeur portée par une souris BALB/c. C'est une lignée métastatique qui mime de près la progression du cancer du sein humain <sup>76</sup>. Nous avons également utilisé une lignée lymphocytaire immortalisée de type CD4+, à savoir la lignée Jurkat E6-1, qui provient du sang périphérique d'un patient de 14 ans atteint d'une leucémie aigüe à cellules T <sup>77</sup>.

Les cellules MDA-MB-231 sont maintenues en culture dans du milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) (L0101, Biowest) supplémenté de 4,5 g/L de glucose, de 2mM de glutamine et de 10% de sérum fœtal bovin (FBS). Tandis que les cellules 4T1 sont maintenues dans un milieu « Roswell Park Memorial Institute Medium » (RPMI) 1640 (L0501, Biowest) supplémenté de 2mM de glutamine, de 1X d'acides aminés non essentiels, de 1mM de sodium pyruvate, de 50 µM de β-mercaptoéthanol et de 10% de FBS. Pour les Jurkat, nous utilisons du milieu RPMI supplémenté de 2mM de glutamine et de 10% de FBS.

#### III.2. Isolement de lymphocytes CD8+

L'isolement de lymphocytes T CD8+ murins s'effectue depuis des rates de souris porteuses de tumeurs. Ces rates sont dissociées entre des lames de verre et le lysat est récupéré dans du milieu sans sérum et filtré à travers un filtre de 70 µm (431751, Corning). Après centrifugation, les globules rouges sont lysés grâce au *red blood lysis buffer* (NH<sub>4</sub>Cl 2,005g, NaHCO<sub>3</sub> 0,21g, EDTA 0,0925g, eau milliQ 25mL). Le lysat est centrifugé et suspendu dans de la BSA 3% (albumine de sérum bovin) (A3294, Sigma-Aldrich) pour passer à l'isolement subséquent.

L'isolement des CD8+ s'effectue grâce à un kit d'enrichissement (130-104-075, Miltenyi) basé sur une sélection négative des CD8+ et une séparation magnétique. La suspension cellulaire est mise en contact avec un cocktail d'anticorps biotinylés et des billes magnétiques coatées de streptavidine. La suspension est ensuite déposée dans des colonnes LS (130-042-401, Miltenyi) placées dans un support magnétique (130-091-051, Miltenyi) puis lavée avec un tampon de séparation (EDTA 2mM, BSA 1,5g, PBS 300 mL) afin de récupérer notre solution enrichie en CD8+.

### III.3. Visualisation du transfert

#### III.3.1. Marquages et cocultures

Les cellules 4T1 ou les MDA-MB-231 sont incubées avec du MBo (1/800) pendant 2h à 37°C. Le MBo ou Methyl diaminobenzene-BODIPY est un *BODIPY* spécifique du MG libre qui peut être détecté en microscopie à fluorescence (498/517 nm). Cette sonde peut être utilisée sur des cellules vivantes pour la détection intracellulaire de MG ainsi que pour la détection du MG dans des échantillons biologiques comme du plasma/sérum <sup>78</sup>.

Les cellules Jurkat ou les CD8<sup>+</sup> isolés de rates sont mis en contact avec du SPY555-DNA (1/1000) pendant 2h à 37°C. Le SPY555-DNA (Spirochrome) est une sonde d'ADN compatible pour l'imagerie des cellules vivantes en microscopie à fluorescence (555/580 nm).

Après marquage, les cellules sontensemencées en ratio 1:1, les 4T1 avec les CD8<sup>+</sup> isolés de rates et les MDA-MB-231 avec les Jurkat.

#### III.3.2. Imagerie cellulaire

Pour visualiser la présence de MG ainsi que son transfert vers les lymphocytes, plusieurs microscopes mis à disposition par la plateforme du GIGA *cell imaging* et la plateforme du CIRM ont été utilisés.

Tout d'abord, l'Incucyte® Sx5 a été utilisé pour mettre au point les conditions expérimentales et pour prévisualiser un potentiel transfert. Les images ont été prises avec un objectif 10X après la mise en contact des deux types de cellules dans une plaque 96 puits (167008, ThermoFisher). Le microscope à épifluorescence Zeiss Apotome a aussi été utilisé pour de premières images avec un objectif 10X avec cette même plaque.

Pour améliorer la résolution de nos images, nous avons utilisé le microscope confocal Zeiss LSM980 AiryScan 2 avec un objectif 40X pour prendre des images après la mise en contact des deux types de cellules. Pour ce microscope, les cellules ont été ensemencées dans des lames compartimentées (80807, Ibidi). Et enfin, pour visualiser les structures intracellulaires avec une haute résolution, nous avons utilisé le microscope CX-A Nanolive en mode image 7x7 avec des cellules ensemencées dans des boîtes de Petri de 35 mm (80136, Ibidi). Le microscope Nikon + Crest Optics Spinning Disk nous a également été mis à disposition lors d'une démonstration proposée par Nikon et la plateforme GIGA *cell imaging*.

### III.4. Western Blot

#### III.4.1. Extraction et dosage protéique

Les protéines sont extraites à partir d'un culot cellulaire pour les cellules en suspension ou à partir d'une monocouche cellulaire pour les cellules adhérentes. L'extraction s'effectue à l'aide d'un *cell*

*scraper* et d'un tampon de lyse composé de SDS 1%, d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases. Le lysat cellulaire collecté dans un tube Eppendorf est soniqué pendant 5 secondes (Vibra Cell) dans le but de fragmenter l'ADN.

Une fois les protéines extraites, la concentration en protéines totales est calculée grâce au kit Pierce BCA Protein Assay (23227, Thermo Scientific). Pour cette quantification, une courbe standard est réalisée avec de la BSA et du SDS 1% en différentes dilutions pour un volume final de 25 µL. Les échantillons d'intérêt (1 µL) sont dilués également dans du SDS 1% dans 25 µL de volume final. Le réactif de dosage est composé d'une solution A (23228, Thermo Scientific) (carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, acide bicinchoninique (BCA), tartrate de sodium et hydroxyde de sodium) et d'une solution B (1859078, Thermo Scientific) (sulfate de cuivre). 200 µL de ce réactif sont ajoutés aux différentes dilutions qui sont ensuite placées dans un incubateur à 60°C pendant 45 minutes. Le dosage des protéines par le BCA est basé sur la réduction de  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{+}$  par les protéines en milieu alcalin. Le BCA forme un complexe violet avec le  $\text{Cu}^{+}$  qui peut être détecté par mesure d'absorbance à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (FilterMax F5, Molecular Devices). L'intensité de la coloration violette est proportionnelle à la concentration en protéines.

#### III.4.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Après extraction et dosage, 20 µg de protéines sont ajoutées à du tampon de chargement (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% glycérol, 2% SDS, 14,4 mM 2-mercaptoéthanol, 0,1% bleu de bromophénol) et dénaturées à 99°C pendant 5 minutes. Un marqueur de poids moléculaire (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific #26616) ainsi que nos échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide. Ce gel est composé de deux parties : un gel de concentration (3.5 % acrylamide) et un gel de séparation (10 % acrylamide pour cibler les MGHs ou 12,5 % acrylamide pour cibler Glo1, AKR1B1 ou ALDH1A3). La séparation des protéines se fait dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration (250 mM Tris-base, 1,92 M Glycine, 1% SDS) à 120 V pendant 1h30.

#### III.4.3. Transfert sur membrane de PVDF

Les protéines séparées grâce à la migration dans le gel de polyacrylamide sont transférées du gel vers une membrane de PVDF (03010040001, Roche) pendant 1h30 à 100 V dans une cuve remplie de tampon de transfert (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 20% méthanol).

#### III.4.4. Immunodétection et révélation

Les sites non spécifiques de la membrane sont bloqués par du lait en poudre dégraissé (A0830, PanReac AppliChem) dissous dans du Tris-Buffered-Saline-Tween (TBS-T, 10 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0,1% Tween) pendant 1h sous agitation à température ambiante.

Pour l'immunodétection, différents anticorps primaires ont été utilisés : mouse anti-GLO1 (1/1000, NBP1-19015, Novus), mouse anti-MGH (1/1000, STA-011, Cell Biolabs), rabbit anti-AKR1B1 (1/1000, 15439-1-AP, Proteintech), rabbit anti-ALDH1A3 (1/1000, ab129815, Abcam) ; dilués dans du TBS-T avec 5% de BSA ou 5% de lait. L'incubation se déroule toute la nuit à 4°C sous agitation. Ensuite, un anticorps secondaire, rabbit anti-mouse (1/3000, P0260, Dako) ou goat anti-rabbit (1/3000, 7074S, Cell Signaling), dilués dans du TBS-T avec 5% de BSA ou 5% de lait, est incubé pendant 1h sous agitation à température ambiante.

La révélation par production de chimiluminescence est réalisée grâce au kit Pierce<sup>TM</sup> ECL Western (32106, Thermo Scientific) et la lecture se fait grâce à l'appareil Alliance Q9 ATOM<sup>TM</sup> Auto (UVITEC).

Les signaux sont normalisés en analysant la  $\beta$ -actine et la quantification est réalisée par une analyse densitométrique à l'aide du logiciel ImageJ.

### III.5. Test de viabilité

Les tests nous permettent de déterminer une concentration inhibitrice médiane de la prolifération (IC50) lors d'un traitement avec un composé chimique afin d'évaluer la sensibilité au traitement des cellules étudiées et de déterminer la concentration de notre composé chimique d'intérêt qui induit une baisse de 50% de leur viabilité. Pour ce faire, les cellules sontensemencées (60 000 cellules/puits) dans une plaque 24 puits. Le lendemain, les cellules sont traitées en triplicat avec des concentrations croissantes de MG, allant de 0 à 1000  $\mu$ M pour les Jurkat ou de 0 à 3000  $\mu$ M pour les MDA-MB-231. Les dilutions du traitement au MG se font à partir d'une solution stock (M0252-25ML, Sigma-Aldrich) et du milieu respectif de chaque cellule. Après 48h d'incubation, pour les MDA-MB-231, le milieu est aspiré, 1 mL de PBS (MS0220B1001, Biowest) est ajouté et la plaque est soniquée. Pour les Jurkat, chaque puits est récupéré dans un tube Eppendorf pour être centrifugé et suspendu dans 1 mL de PBS, et les tubes sont passés au sonicateur. Dans une plaque 96 puits UV star (655801, Greiner bio-one), nous distribuons 100  $\mu$ L de chaque échantillon à tester, puis 100  $\mu$ L de solution de révélation. Cette solution de révélation est une solution de Hoechst diluée 100x dans du PBS. Nous laissons la solution agir pendant 10 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Le Hoechst peut se fixer aux séquences riches en A-T de l'ADN et émettre de la fluorescence qui sera lue à 465 nm au spectrophotomètre. Une courbe est établie à partir des mesures obtenues pour chacune des concentrations et permet de déterminer la valeur d'IC50 (GraphPad Prism).

### III.6. Test d'activité enzymatique

#### III.6.1. Extraction et dosage protéique

Les protéines sont extraites à partir d'un culot cellulaire pour les cellules en suspension ou à partir d'une monocouche cellulaire pour les cellules adhérentes à l'aide d'un *cell scraper* grâce à un

tampon de lyse composé de RIPA, d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases. Le lysat cellulaire est collecté dans un tube Eppendorf et les tubes sont placés sous agitation à 4°C pendant 40 minutes. Après incubation, les tubes sont centrifugés à 14 000 rpm à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré pour le dosage.

### III.6.2. Mesure de l'activité enzymatique de GLO1

Un tampon de réaction est préparé en mélangeant du PBS 50 mM, du MG 10 mM et du glutathion réduit (GSH) 10 mM. Ce tampon est mis sous agitation pendant 15 minutes à température ambiante.

Pour les mesures d'activité enzymatique des cellules, 10 µg de protéines sont ajoutés dans chaque puits d'une plaque 96 puits UV star, puis chaque puits est complété avec du RIPA pour atteindre un volume final de 10 µL. Cette procédure est réalisée en triplicat, avec du RIPA seul utilisé comme blanc. Au dernier moment, 200 µL du tampon de réaction sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite lue toutes les 30 secondes au spectrophotomètre à 239 nm pendant 20 minutes. Le calcul de l'activité se fait pendant la phase exponentielle (environ 6 minutes) et consiste à mesurer l'apparition du produit de la réaction catalysée par l'enzyme étudiée, à savoir le S-D-lactoylglutathion, produit de la réaction de l'enzyme GLO1.

### III.7. Cytométrie en flux

Le FACSFortessa, mis à disposition par la plateforme GIGA *flow cytometry*, a été utilisé pour appuyer les observations faites en imagerie mais aussi pour réaliser des analyses fonctionnelles sur les lymphocytes après coculture.

Pour observer le transfert de méthylglyoxal depuis les cellules cancéreuses vers les lymphocytes, les différents types cellulaires sont marqués de la même façon que pour l'imagerie (voir III.3.1.) et mis en coculture dans une plaque 24 puits pendant 2 heures. Des cocultures ont également été effectuées en séparant les deux populations cellulaires par une membrane poreuse (662 638, Greiner bio-one) empêchant les contacts mais leur permettant de partager le même milieu. Après 2h, les cellules sont récupérées dans des tubes dédiés au FACS (352008, Falcon) et puis centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes. Les tubes sont décantés puis resuspendus dans 400 µL de PBS avant une nouvelle centrifugation. Après un lavage au PBS, la PAF 1% (11699408, VWR) est ajoutée durant 30 minutes à 4°C pour la fixation des cellules avant resuspension dans du PBS-BSA 3%. Les tubes sont placés à 4°C à l'obscurité jusqu'au moment de l'analyse au cytomètre.

Pour l'analyse fonctionnelle, un panel de différents marquages est réalisé sur les CD8<sup>+</sup> isolés de rates murines après coculture.

Cible	Fluorochrome	Référence	Fournisseur
CD8a	PercP-Cy5.5	100734	Biolegend
Perforine	PE	12-9392-82	Invitrogen
Granzyme B	APC	372204	Biolegend
IFN $\gamma$	PE-Cy7	505826	Biolegend
Zombie NIR (viabilité)	Émission similaire à APC-Cy7	423105	Biolegend

Pour faire ces analyses, les CD8<sup>+</sup> isolés sont mis 2h en coculture avec des 4T1 préalablement marquées au MBo. Pour certaines conditions, nous avons utilisé des billes CD3/CD28 (11452D, ThermoFisher) pour l'activation des CD8<sup>+</sup>.

Après la coculture, les cellules sont récupérées pour procéder aux marquages séquentiels de des différentes cibles, à commencer par le Zombie NIR. Ensuite, il faut bloquer les sites non spécifiques avec du FC block CD16/CD32 (553142, BD Pharmigen) pour réaliser les marquages extracellulaires (CD8). Et pour finir, un kit de Fix/Perm (00-5523-00, Invitrogen) est utilisé afin de poursuivre avec les marquages intracellulaires (perforine, granzyme B et IFN $\gamma$ ). Les cellules sont fixées avec de la PAF 1%.

Une matrice de compensation a été nécessaire pour ce panel et a été effectuée à l'aide de billes de compensation (A10346, A10628, Invitrogen et 01-2222-41, Invitrogen). Les analyses ainsi que la stratégie de gating sont réalisés sur le logiciel FlowJo vX.0.7.

## IV. Résultats

### IV.1. Mise au point des conditions de coculture entre des lymphocytes et des cellules cancéreuses

Avant de mettre les cellules en coculture, nous devons d'abord fixer certains paramètres afin d'optimiser nos expériences futures. Pour ce faire, nous allons évaluer le milieu de culture, les différents marquages ainsi que la densité et le ratio des cellules mises en présence.

#### IV.1.1. Choix du milieu pour la coculture des lymphocytes et des cellules cancéreuses

Une coculture est une méthode de culture cellulaire dans laquelle deux types cellulaires différents ou plus sont cultivés ensemble dans le même environnement. De plus, les cellules mises en coculture ne possèdent pas forcément les mêmes milieux de culture préférentiels. Il est donc important de choisir un milieu qui sera optimal pour les différents types cellulaires afin de ne pas impacter la coculture.

En ce qui concerne la coculture des cellules MDA-MB-231 avec les cellules Jurkat, nous avons évalué s'il était préférable d'utiliser le milieu DMEM ou le milieu RPMI. Nous avons mis chacune des lignées en culture pendant 48h dans son propre milieu ou dans le milieu de l'autre lignée. Visuellement, comme il était difficile d'observer des changements quelconques, nous avons procédé à un comptage des cellules (Figure 11A). Nous pouvons observer que les MDA-MB-231 se cultivent de manière similaire dans les deux milieux. En revanche, les Jurkat se cultivent mieux dans leur milieu spécifique. C'est pourquoi, pour cette coculture, nous avons décidé d'utiliser le milieu de culture des Jurkat.

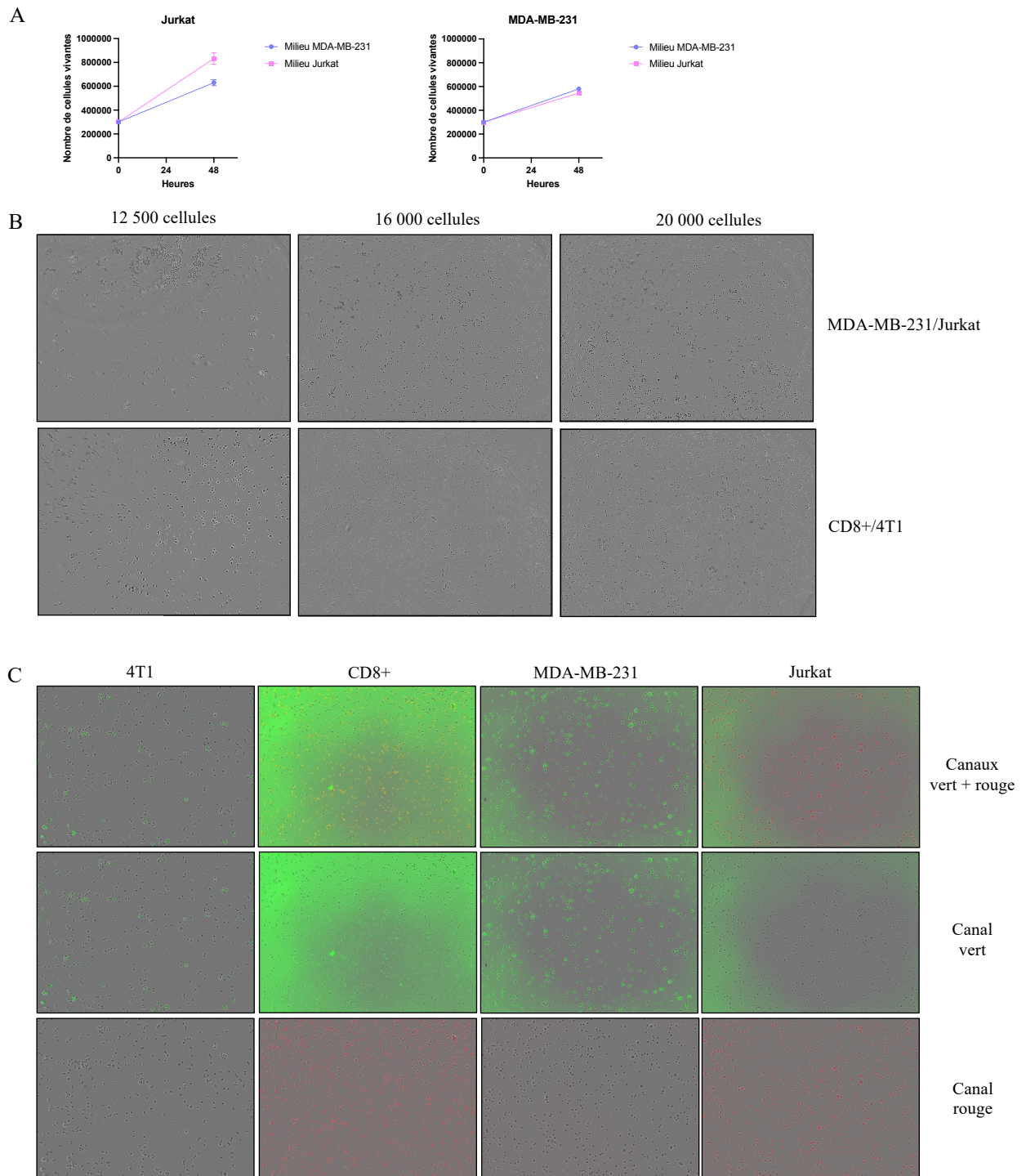
Concernant la coculture des cellules 4T1 avec les CD8<sup>+</sup> isolés de rate, nous n'avons pas réalisé cette même expérience préalable. Nous nous sommes appuyés sur un protocole publié dans *STAR Protocol*<sup>79</sup>, qui recommande un milieu de culture destiné aux cellules T issues de tissus lymphoïdes murins, lequel s'est avéré relativement similaire à celui utilisé pour les cellules 4T1. Par conséquent, nous utiliserons le milieu de culture des cellules 4T1 pour la coculture avec les CD8<sup>+</sup>.

#### IV.1.2. Choix du ratio et de la densité cellulaire pour la coculture des lymphocytes et des cellules cancéreuses

##### IV.1.2.1. Choix du ratio cellulaire

Pour le choix du ratio cellulaire, qui représente la proportion de chaque population présente dans la coculture, nous avons décidé d'utiliser le même ratio que celui utilisé dans l'étude de Baumann et al.<sup>72</sup>, à savoir un ratio 1:1 (cellules cancéreuses:lymphocytes), ce qui veut dire que la coculture se composera de la même quantité de cellules cancéreuses que de lymphocytes.





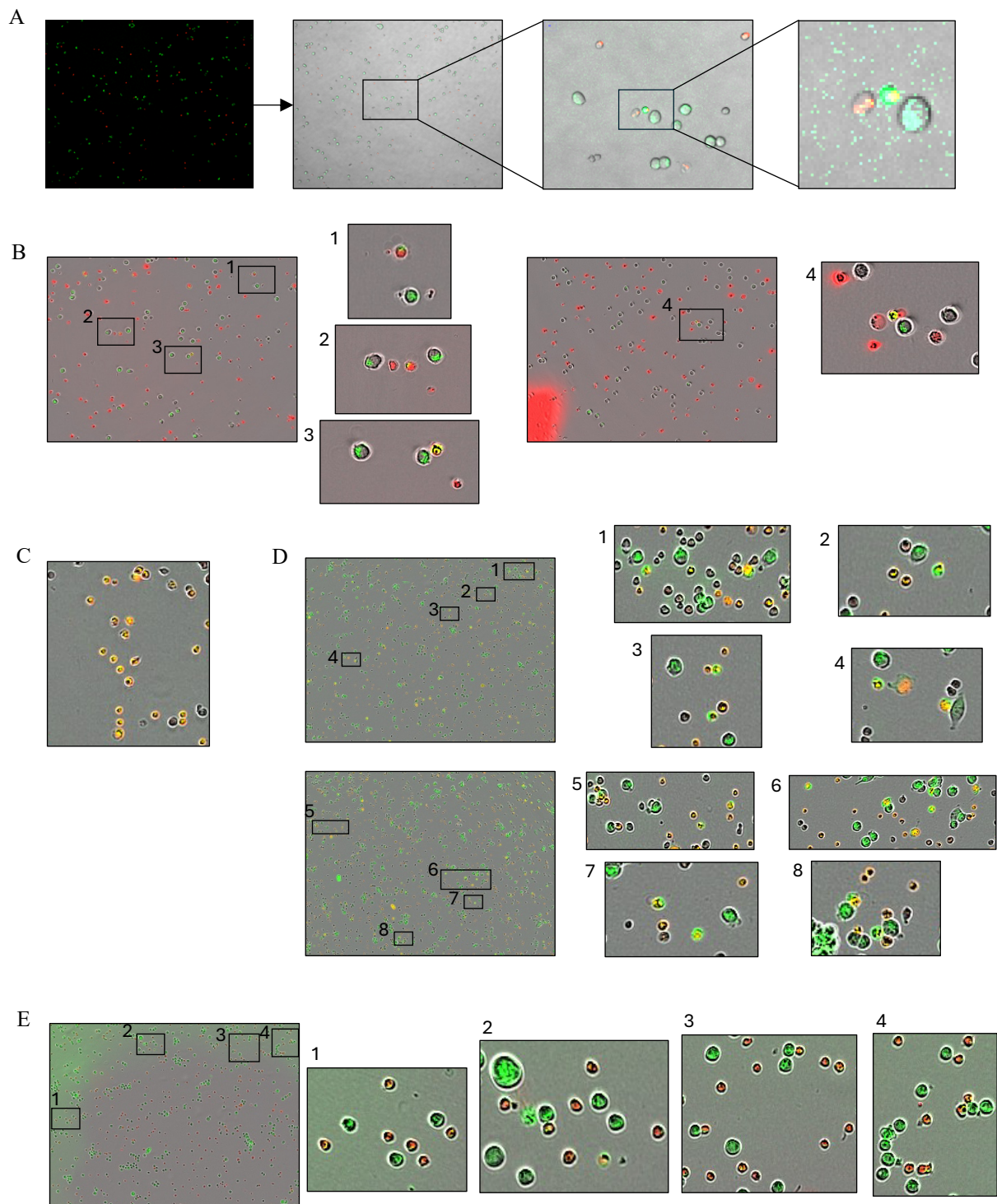
**Figure 11 : Mise au point des conditions de culture entre lymphocytes et cellules cancéreuses. (A)** Graphiques représentant le nombre de cellules vivantes pour les Jurkat (à gauche) et pour les MDA-MB-231 (à droite) après 48h de culture dans du milieu Jurkat ou du milieu MDA-MB-231. **(B)** Images prises avec l'Incucyte de densités cellulaires de 12 500, 16 000 ou 20 000 cellules pour la coculture CD8/4T1 ou la coculture MDA-MB-231/Jurkat en plaque 96 puits. **(C)** Images des différents signaux grâce à l'Incucyte avec, de gauche à droite, les 4T1 marquées au MBo, les CD8+ marqués au SPY555-DNA, les MDA-MB-231 marquées au MBo et les Jurkat marquées au SPY555-DNA. Chacune des populations est étudiée sous les différents canaux de fluorescence, à savoir le vert et le rouge. Grossissement : x10 (excepté image 12 500 cellules CD8+/4T1 figure B, x20).

#### IV.1.2.2. *Choix de la densité cellulaire*

Pour optimiser nos chances de visualiser un transfert, il faut choisir une densité cellulaire assez importante pour maximiser les probabilités d'interaction entre les cellules. Cependant, il ne faut pas choisir une densité trop élevée sous peine de voir les cellules se superposer et que les possibles transferts soient difficiles à visualiser. Afin de répondre à cette question, nous avons observé différentes densités cellulaires de coculture dans une plaque 96 puits, et nous avons pris des images des puits grâce à l'Incucyte®. Nous avons d'abord essayé avec une densité de 12 500 cellules/puits (Figure 11B). Nous pouvons observer que pour la coculture MDA-MB-231/Jurkat, la densité est trop faible et qu'il y a un problème d'homogénéisation des cellules sur toute la surface du puits. Pour la coculture 4T1/CD8+, les cellules se répartissent assez bien sur la surface du puits, mais dû à une erreur de notre part, cette image a été prise à plus fort grossissement. Malgré cette erreur, on peut observer que les cellules restent relativement espacées, donc la densité cellulaire pourrait être augmentée. C'est pour cette raison que nous avons ensuite essayé en ensemençant 16 000 et 20 000 cellules/puits, avec cette fois-ci un nombre appréciable de cellules ainsi qu'une distribution homogène (Figure 11B). Ces observations de densité, obtenues en plaque 96 puits, nous permettront plus tard d'extrapoler le nombre de cellules à utiliser en coculture pour d'autres techniques d'imagerie en fonction de la surface disponible pour la mise en culture.

#### IV.1.3. *Vérification des fluorophores utilisés pour visualiser la coculture par imagerie cellulaire*

Afin de visualiser le transfert, nous avons choisi de marquer chacune de nos populations avec des fluorophores distincts. Il était donc nécessaire de vérifier au préalable que la sonde SPY555-DNA et le *BODIPY* MBo étaient compatibles et efficaces pour marquer respectivement les cellules lymphocytaires et tumorales. Pour cela, nous avons utilisé le microscope Incucyte® qui se trouve être assez facile d'utilisation. Le but est de voir si chaque population est correctement marquée et qu'il n'y a pas de faux positif, c'est-à-dire aucune cellule verte en l'absence de *BODIPY*, ni de cellule rouge en l'absence de SPY. Cette absence de marquage cellulaire non spécifique est essentielle pour nos analyses, car dans le cadre de l'étude du transfert de marqueur entre cellules, la présence initiale de lymphocytes déjà positifs au signal vert compromettrait l'interprétation des résultats. D'abord, nous observons que chaque population présente la fluorescence qui lui a été associée, les lymphocytes sont positifs au SPY et donc apparaissent rouges, et les cellules cancéreuses sont positives au MBo et donc apparaissent vertes (Figure 11C). Nous pouvons également constater que, pour les cellules cancéreuses, aucun signal n'est détecté lorsque le canal rouge est allumé, donc aucun faux-positif dans le rouge pour les cellules cancéreuses (Figure 11C). En revanche, une fluorescence verte de bruit de fond d'apparition et d'intensité variables est observée sur certaines images obtenues avec l'Incucyte® (Figure 11C). Cette fluorescence non spécifique semble surtout visible sur les lymphocytes alors qu'ils ne sont pas marqués au MBo au départ. Pour les cellules cancéreuses, ce signal parasite semble plus faible voire absent



**Figure 12 : Premières visualisations d'un transfert de MG grâce à l'Incucyte et l'Apotome.** Images représentatives venant de cocultures à 12 500 cellules de CD8+ marqués au SPY555-DNA avec des 4T1 marquées au MBo, (A) prises à l'Apotome quelques minutes après la mise en contact ou (B) à l'Incucyte après 1h30. (C) Image des CD8+ marqués au SPY555-DNA prise à l'incucyte. (D) Images représentatives venant de cocultures à 16 000/20 000 cellules de CD8+ marqués au SPY555-DNA avec des 4T1 marquées au MBo, prises à l'Incucyte après 1h30. (E) Images représentatives venant d'une coculture à 16 000 cellules de Jurkat marqués au SPY555-DNA avec des MDA-MB-231 marquées au MBo, prises à l'Incucyte après 1h30. Grossissement : x10 (excepté figure 12B, x20).

(Figure 11C). Par conséquent, par la suite, il sera nécessaire de corriger cet important signal de fond de manière optimale afin de permettre une analyse plus fiable des résultats avec l'Incucyte®.

## IV.2. Première visualisation d'un transfert de méthylglyoxal entre des cellules cancéreuses et des lymphocytes : Incucyte® et Apotome

En théorie, nous mettons en coculture des cellules cancéreuses marquées pour le MG grâce au MBo en vert avec des lymphocytes marqués en rouge par la SPY. S'il y a un transfert de MG de la cellule cancéreuse vers le lymphocyte, nous nous attendons à observer des lymphocytes rouges ayant reçu du MG marqué par le MBo et donc des lymphocytes à noyaux rouges montrant un liseré vert ou l'apparition d'une coloration jaune témoignant de l'apparition de lymphocytes doublement marqués dans le champ microscopique.

### IV.2.1. Visualisation de la coculture cellules cancéreuses-lymphocytes à l'aide de l'Apotome

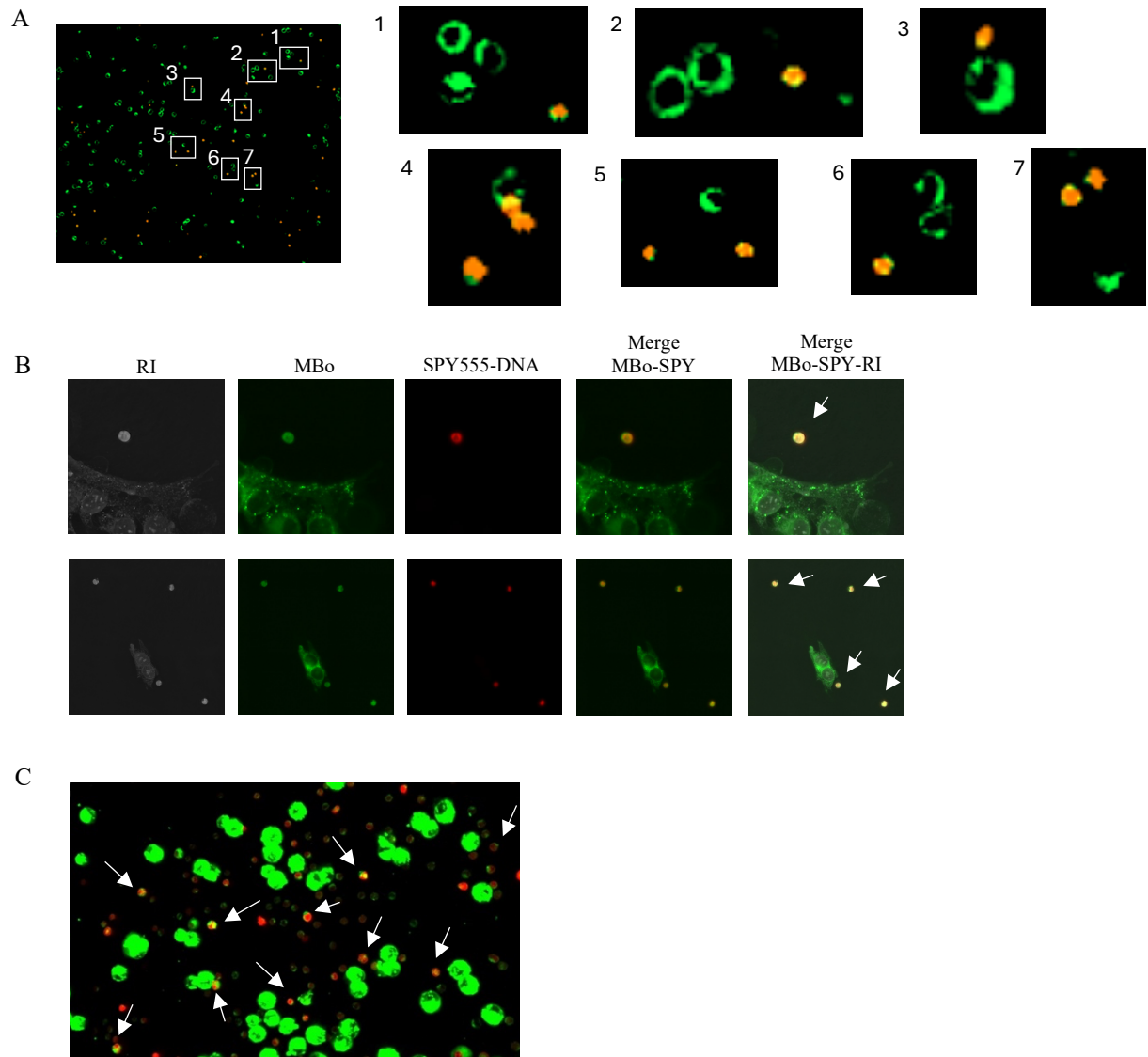
Avec cette première coculture, nous avons d'abord observé les puits à l'aide de l'Apotome quelques minutes après la mise en contact des cellules. À première vue, il a été difficile d'observer des lymphocytes doublement marqués à l'aide de ce microscope, à l'exception d'une cellule de petite taille, correspondant à un lymphocyte, qui a attiré notre attention après différentes corrections d'image, au niveau de laquelle nous pouvons voir du MG détecté en vert autour d'un noyau apparaissant jaune (Figure 12A).

### IV.2.1. Visualisation de la coculture cellules cancéreuses-lymphocytes à l'aide de l'Incucyte®

Nous avons ensuite observé cette coculture avec l'Incucyte®. Cette fois-ci, après 1h30 de coculture dans l'incubateur de l'Incucyte®, plusieurs petites cellules ont attiré notre attention (Figure 12B) et ont montré une coloration jaune/verte et rouge, tout en étant proche de cellules cancéreuses (cellules vertes), suggérant une hypothèse de potentielle interaction. Ces événements n'étant pas majoritaires sur l'entièreté de l'image, nous avons décidé de réitérer cette expérience d'une part, pour tenter d'observer les mêmes phénomènes et d'autre part, pour évaluer si nous pouvons en observer plus en augmentant la densité. En effet, ce premier test de coculture a été réalisé en parallèle de l'observation des différentes densités cellulaires et l'observation de cette première coculture (12 500 cellules/puits) a été un argument de plus pour augmenter la densité cellulaire à 16 000 ou 20 000 cellules/puits (voir section IV.1.3.). Par la suite, nous avons fait des cocultures soit de 4T1/CD8+ soit de MDA-MB-231/Jurkat, avec 16 000 et 20 000 cellules/puits et observées à l'Incucyte® uniquement.

Pour ces deuxièmes tentatives, un background vert se présente à nouveau sur certaines images avec une intensité variable, nous avons donc essayé de corriger les images au mieux avant de les analyser. En ce





**Figure 13 : Confirmation de la visualisation d'une transfert de MG grâce à la microscopie confocale et au Nanolive. (A)** Images représentatives venant d'une coculture de CD8+ marqués au SPY555-DNA avec des 4T1 marquées au MBo, prises au LSM980. Grossissement : x40. **(B)** Images représentatives venant d'une coculture de CD8+ marqués au SPY555-DNA avec des 4T1 marquées au MBo, prises au Nanolive. Images récoltées pour les différents signaux (RI, Mbo, SPY555-DNA) et superposées pour les images *Merge*. Grossissement : x63. **(C)** Image représentative venant d'une coculture de CD8+ marqués au SPY555-DNA avec des 4T1 marquées au MBo, prises au Spinning Disk. Grossissement : x40.

qui concerne la coculture CD8+/4T1, ce background vert présent sur les images nous empêche hélas de tenter toute interprétation. En effet, nous avons essayé de corriger cette fluorescence de fond mais malheureusement, nous observons que les CD8+ gardent un signal résiduel de ce background et apparaissent oranges/jaunes avant coculture (Figure 12C), compromettant ainsi la visualisation d'un transfert. Nous pouvons malgré tout remarquer qu'après 1h30, certaines cellules semblent présenter de la fluorescence verte (Figure 12D) mais nous ne pourrions pas confirmer de transfert avec cette expérience. Pour la coculture MDA-MB-231/Jurkat, nous avons observé différentes cellules avec un liseré vert ou l'apparition de couleur jaune avec leur noyau rouge (Figure 12E). Et pour cette coculture, le background vert était de faible intensité et nous a semblé ne pas avoir d'incidence sur les observations.

Malgré le fait que l'Incucyte® ait été particulièrement utile pour mettre au point les conditions expérimentales et faire ces premiers tests de coculture, de par sa facilité d'utilisation et l'acquisition d'images en temps réel, nous constatons que ce microscope présente quelques limites pour notre application avec la fluorescence parasite mais aussi au niveau de la résolution (environ 2 µm)<sup>80</sup>. C'est pourquoi nous nous sommes dirigés vers d'autres microscopes comme le microscope confocal ou encore le Nanolive par exemple (résolution d'environ 200 nm)<sup>81, 82</sup> afin de tenter d'améliorer la vision d'un transfert. De plus, dans la suite de ce mémoire, nous nous concentrerons principalement sur les cocultures 4T1/CD8+.

### IV.3. Confirmation de la visualisation du transfert de méthylglyoxal entre des cellules cancéreuses et des lymphocytes

#### IV.3.1. Visualisation à l'aide du microscope confocal LSM980

En premier, nous avons testé le microscope LSM980 qui est un microscope confocal, ce qui signifie que nous obtenons des signaux provenant d'un seul plan focal, ce qui améliore la résolution. En utilisant ce type d'imagerie, nous espérons pouvoir observer avec plus de précision un point de contact entre les deux types de cellules et au mieux, un transfert s'établir entre les deux. Alors qu'avec un microscope à épifluorescence, nous n'avons aucune information sur la localisation du signal de fluorescence de nos cellules puisque l'appareil récolte la fluorescence de l'entièreté de notre échantillon. Nous n'avons pas pu visualiser un potentiel point de contact cellulaire et ni même l'échange entre les deux types de cellules en présence. Par contre, nous avons pu observer à nouveau des cellules CD8+ avec leur noyau rouge reconnaissable entouré d'un liseré vert ou bordé de plusieurs zones vertes (Figure 13A).

#### IV.3.2. Visualisation à l'aide du Nanolive

Ensuite, nous avons testé le Nanolive car ce microscope promettait, en plus des images en fluorescence, des images hautement résolues des structures intracellulaires par tomographie. Avec cette technique, nous pouvions peut-être imaginer obtenir des détails structurels du transfert en question.

Cependant, il nous a été difficile de trouver des champs analysables pour nos acquisitions d'images que ce soit en termes de densité ou d'hétérogénéité des types cellulaires. Ainsi, malgré la difficulté de la mise en place des prises d'images, nous avons tout de même pu constater sur quelques cellules et en superposant les différents canaux que certains noyaux rouges colocalisaient avec un signal vert, donnant ainsi des cellules à l'apparence orange avec des zones vertes en combinant les signaux du MBo et de la SPY (Figure 13B).

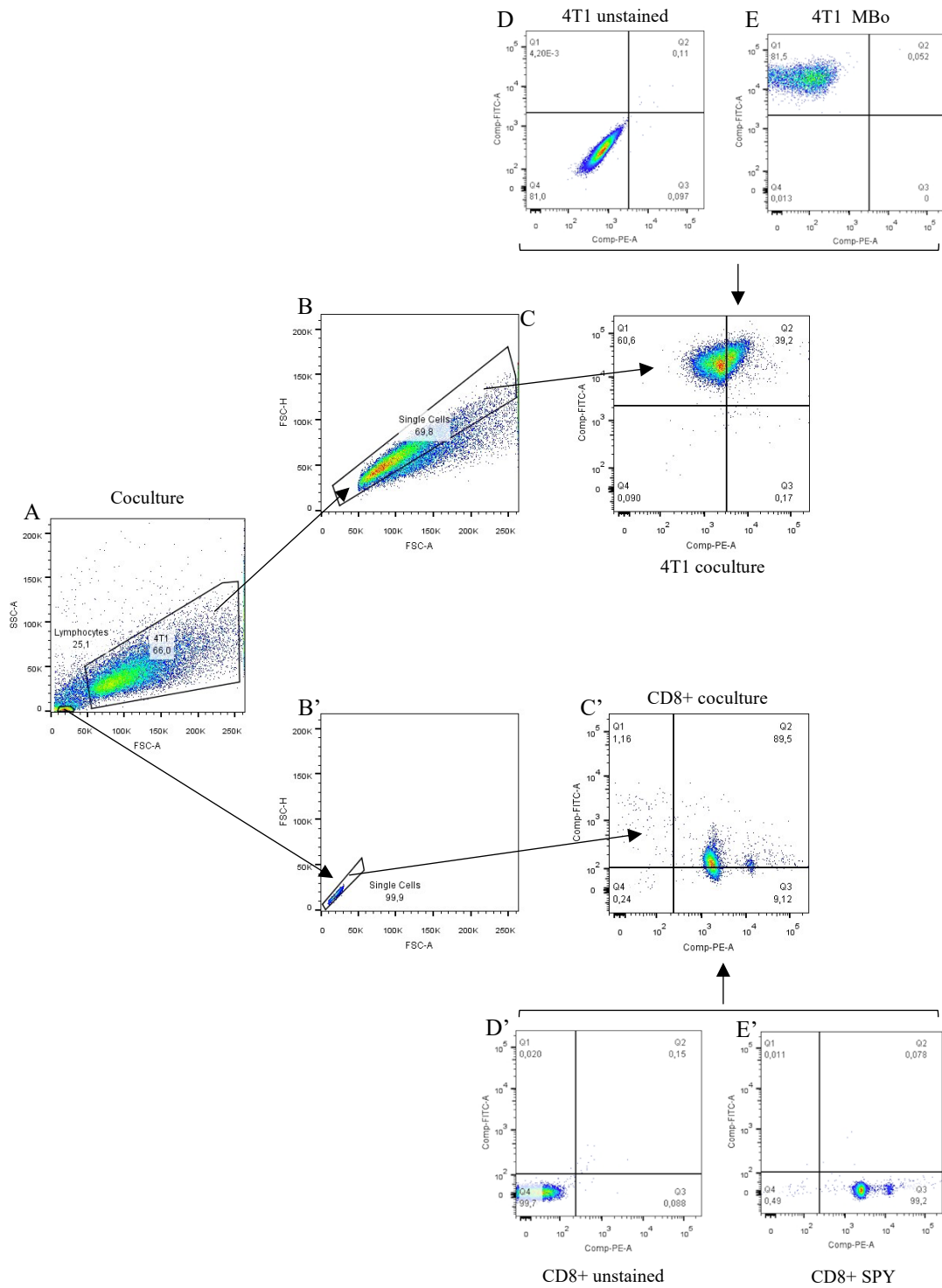
#### IV.3.3. Visualisation à l'aide du microscope confocal Spinning Disk

En plus de tous les microscopes mentionnés jusqu'à présent, nous avons également pu tester le microscope confocal Spinning Disk présent en démonstration à la plateforme imagerie pendant mon mémoire. Ce microscope possède un disque rotatif composé de multiples *pinholes* qui permet d'imager toute une zone en même temps ce qui rend l'acquisition plus rapide qu'un autre microscope confocal. En utilisant ce microscope, puisque les images sont prises plus rapidement, nous nous attendions à augmenter nos chances de visualiser un transfert « en direct » à l'image. Étant donné que cet appareil était en démonstration, nous avons confié notre échantillon à imager au représentant de cet appareil qui a pu prendre quelques images de la coculture. Même si nous n'avons toujours pas observé de transfert intercellulaire à proprement parler à l'image, nous pouvons tout de même voir sur l'image obtenue que les CD8<sup>+</sup> apparaissent avec un halo vert autour de leur noyau rouge, ces lymphocytes apparaissent de manière convaincante et en large nombre (Figure 13C).

En conclusion, après avoir réalisé cette coculture de CD8<sup>+</sup>/4T1 plusieurs fois et en utilisant différents microscopes, nous pouvons conclure que les CD8<sup>+</sup> deviennent positifs au MBo après coculture avec les 4T1. Mais nous ne pouvons pas encore conclure sur le fait que ce transfert nécessite un contact intercellulaire entre les deux types de cellules pour que les CD8<sup>+</sup> deviennent positifs au MBo.

#### IV.4. Utilisation du FACS pour étudier le transfert de méthylglyoxal entre des lymphocytes et des cellules cancéreuses

Utiliser l'imagerie pour visualiser le transfert de méthylglyoxal nous a permis d'obtenir de premiers résultats et de mettre au point les conditions de coculture. La cytométrie de flux, dotée d'une grande sensibilité, nous permettra d'une part de confirmer ou au contraire de démentir ce que nous avons pu observer en imagerie et d'autre part, de nous apporter un aspect quantitatif général. Pour ce faire, nous utiliserons les mêmes marqueurs qu'en imagerie, à savoir la SPY pour les CD8<sup>+</sup> et le MBo pour les 4T1.



**Figure 14 : Stratégie de gating des cellules cancéreuses et des lymphocytes en coculture pour le FACS.** À partir du dot plot FSC/SSC, deux populations sont formées : les CD8+ et les 4T1 (A). Pour chaque population, une stratégie similaire se profile avec une sélection des singlets à partir des graphes FSC-A/FSC-H (B/B') et l'analyse de ces singlets sur un dot plot biparamétrique SPY555-DNA/MB0 (C/C'). Les gates des dot plots SPY555-DNA/MB0 sont placées grâce aux échantillons contrôles non marqués (D/D') et marqués (E/E').



#### IV.4.1. Stratégie de gating des lymphocytes et des cellules cancéreuses en coculture

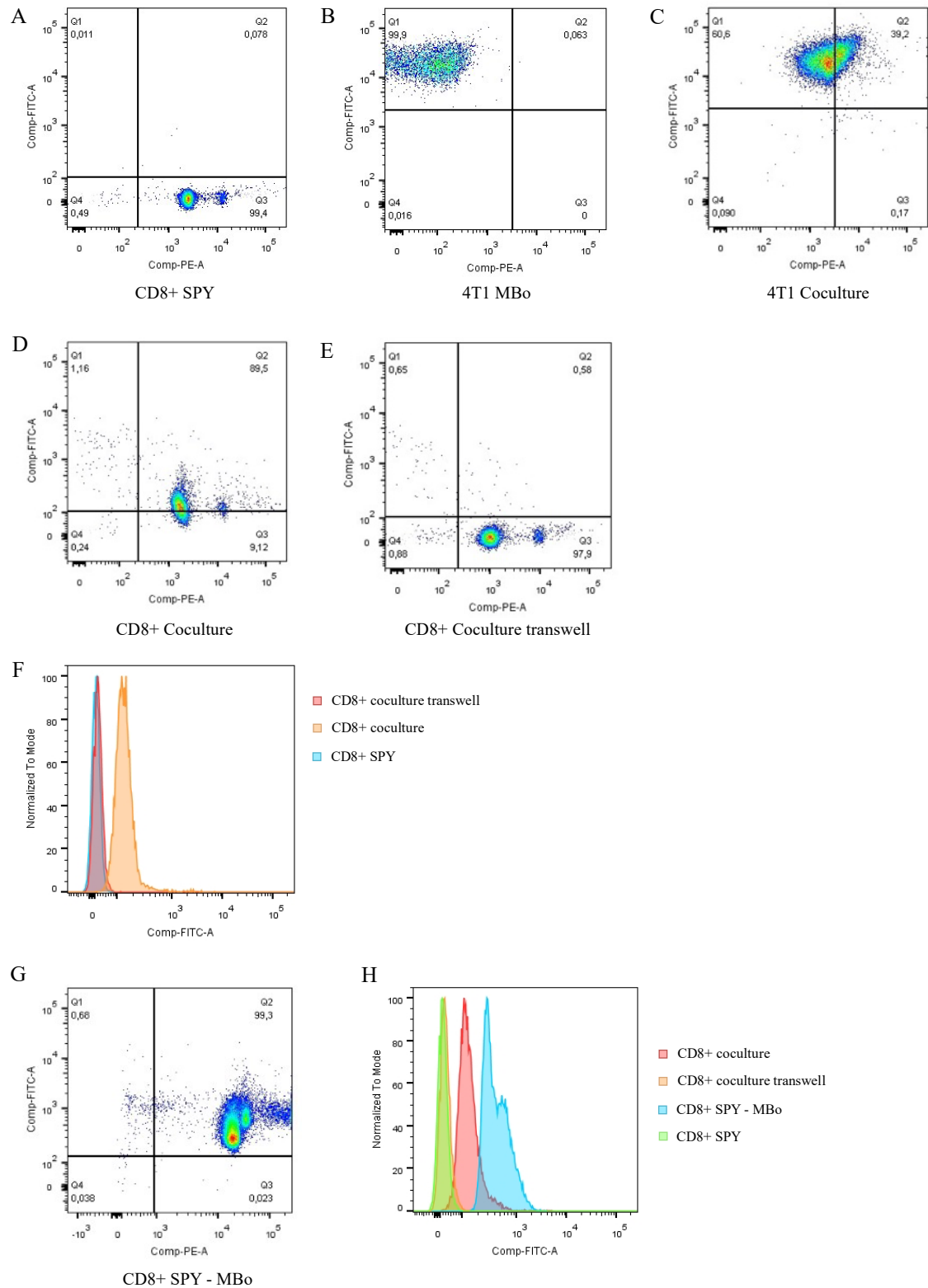
Dans un premier temps, nous devons établir la stratégie de gating. En récupérant nos cellules des puits de coculture, toutes ces cellules feront partie d'un même échantillon au moment de la lecture par le cytomètre. Par conséquent, il faut pouvoir différencier chaque type cellulaire sur les dot plots résultants. Nous avons remarqué que le profil de taille est relativement différent entre les deux types de cellules ce qui nous permet de placer nos premières fenêtres ou gates sur le dot plot FSC/SSC pour différencier les 4T1 des CD8+ (Figure 14A), ces derniers étant plus petits que les 4T1<sup>83</sup>. À partir de ces deux populations, deux stratégies de gating se profilent et sont basées sur la lecture d'échantillons de CD8+ seuls ou de 4T1 seules sans aucun marquage ou avec leurs marqueurs respectifs pour pouvoir placer les limites de positivité des différentes fluorescences. Tout d'abord pour chacune des populations, une exclusion des doublets est réalisée avec le graphique FSC-A/FSC-H (Figure 14B/B'). Ensuite, nous utilisons un dot plot avec pour ordonnée la fluorescence du MBo et pour abscisse la fluorescence de la SPY (Figure 14C/C'). Les gates de positivité seront mises en fonction des nuages de points des cellules contrôles non marquées (Figure 14 D/D'), utilisées comme contrôle négatif et dans un second temps vérifiées avec les cellules positives aux marqueurs (Figure 14E/E'). Ensuite, toute cette stratégie de gating sera appliquée à nos conditions de coculture. En plus de ça, grâce aux échantillons de CD8+ ou 4T1 marqués (Figure 14E/E'), nous avons pu également vérifier que nos marqueurs fonctionnaient pour les expériences de cytométrie et que nous utilisions les bonnes conditions.

#### IV.4.2. Confirmation du transfert de méthylglyoxal entre des cellules cancéreuses et des lymphocytes grâce au FACS

Une fois que la stratégie de gating est mise en place et que les marqueurs sont vérifiés, nous pouvons passer à l'analyse des échantillons de coculture.

Dans un premier temps, nous avons pu remarquer que les CD8+ seuls marqués à la SPY ne présentent pas de positivité pour la fluorescence au MBo avant d'être mis en coculture, ce qui est une bonne chose pour voir ou non l'apparition d'un transfert par la suite (Figure 15A). Nous pouvons aussi constater que les 4T1 marquées au MBo sont bien positives à cette fluorescence avant de les mettre en coculture, montrant ainsi que le métabolite dont il est question ici était bien marqué avant le transfert potentiel (Figure 15B).

Ensuite, si on se plonge dans l'analyse des cellules issues de la coculture, nous pouvons confirmer que les 4T1 qui ont été mises en contact avec les CD8+ sont bien les 4T1 positifs à la fluorescence du MBo que nous avons mentionné ci-dessus (Figure 15C). En revanche, nous pouvons aussi remarquer que ces 4T1 deviennent légèrement positifs à la SPY. Cette positivité est due à l'absence de lavages suite au marquage des CD8+ avec la SPY sous peine de perdre des cellules très précieuses lors de centrifugations



**Figure 15 : Confirmation du transfert de MG des cellules cancéreuses vers les lymphocytes grâce au FACS. Première coculture :** Dot plots biparamétriques SPY555-DNA/MBo d'analyse par cytométrie en flux des (A) CD8+ marqués au SPY555-DNA, (B) des 4T1 marquées au MBo, (C) des 4T1 marqués au MBo issus de la coculture, (D) des CD8+ marqués au SPY555-DNA issus de la coculture, (E) des CD8+ marqués au SPY555-DNA issus de la coculture avec transwell. (F) Histogramme comparatif pour la fluorescence au MBo des CD8+ par cytométrie en flux. **Deuxième coculture :** (G) Dot plot biparamétriques SPY555-DNA/MBo d'analyse par cytométrie en flux des CD8+ marqués au SPY555-DNA+MBo. (H) Histogramme comparatif pour la fluorescence au MBo des CD8+ par cytométrie en flux.

souvent peu efficaces pour ces petites cellules en suspension. Par conséquent, c'est une observation à laquelle nous nous attendions mais qui n'entrave pas nos observations centrées sur les lymphocytes.

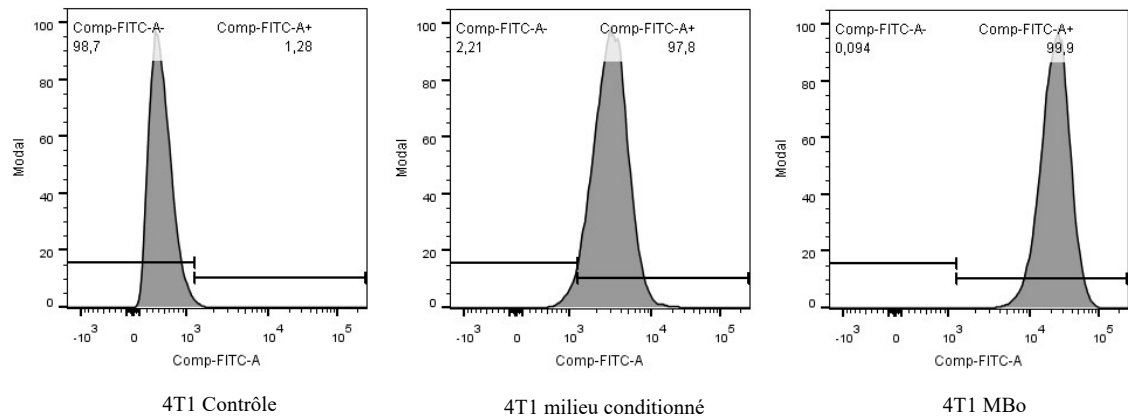
En ce qui concerne les CD8<sup>+</sup> issus de la coculture, dans une démarche similaire à l'imagerie, si un transfert se produit entre les deux types de cellules, nous nous attendons à observer l'apparition d'une population de lymphocytes positive aux deux marqueurs, à savoir la SPY et le MBo. Nous avons observé une augmentation de la fluorescence liée au MBo qui se traduit par un décalage de notre nuage de points sur l'axe des ordonnées donnant ainsi l'apparition d'une population de lymphocytes doublement marqués. Il apparaît donc que les CD8<sup>+</sup> provenant de cette coculture sont devenues positives au MBo (Figure 15D). Ce dot plot nous renseigne aussi sur l'aspect quantitatif et nous montre que 89,5% de la population ciblée dans cette coculture est devenue positive au MBo. Grâce à ces observations, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les 4T1 sont capables de transférer efficacement du MG aux CD8<sup>+</sup>. Nous pouvons alors nous poser cette question : est-ce que nous observons réellement un transfert par contact intercellulaire ou est-ce que l'apparition de fluorescence chez les CD8<sup>+</sup> est plutôt due à une libération de MG ou de MBo dans le milieu de la coculture ?

Pour répondre à cette question, nous allons réaliser une condition de coculture avec un « *transwell* », ou membrane poreuse, afin de séparer physiquement les deux types de cellules et empêcher les contacts intercellulaires tout en maintenant les échanges dans le milieu. Après coculture avec cette membrane, nous pouvons constater que les CD8<sup>+</sup> ne présentent pas de décalage vers le haut pour la fluorescence du MBo (Figure 15E) comme nous avons pu le voir précédemment (Figure 15D). Le pourcentage de cellules positives au MBo ne vaut que 0,5% pour cette coculture. Nous pouvons également constater que ce nuage de points est comparable à celui des CD8<sup>+</sup> seuls marqués à la SPY qui sont notre contrôle négatif pour le MBo chez les CD8<sup>+</sup> (Figure 15A).

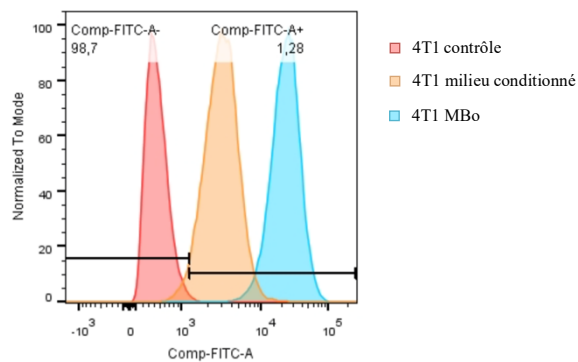
Afin de présenter ces résultats de manière plus claire et de pouvoir comparer les conditions au mieux, nous avons combiné tous ces résultats sur un histogramme avec comme paramètre en abscisse l'intensité de fluorescence du MBo (Figure 15F).

Pour confirmer ces résultats, nous avons réitéré l'expérience avec cette fois-ci un contrôle supplémentaire. À savoir, une comparaison du MG transféré par rapport au niveau de MG endogène des CD8<sup>+</sup>. Pour cela, nous avons utilisé des CD8<sup>+</sup> volontairement doublement marqués avec le MBo et la SPY (Figure 15G) que nous avons pu comparer avec les CD8<sup>+</sup> issus de la coculture. Premièrement, cette expérience nous a permis d'affirmer que les CD8<sup>+</sup> produisent de manière endogène du MG. Dans un second temps, nous pouvons observer que le profil de la population de CD8<sup>+</sup> issus de la coculture apparaît avec une fluorescence moindre que celle des CD8<sup>+</sup> contrôles marqués au MBo (Figure 15H). Ensemble, toutes nos observations confirment que le transfert de MG de cellules cancéreuses vers des lymphocytes est un phénomène possible et nécessitant un contact entre les 2 populations cellulaires.

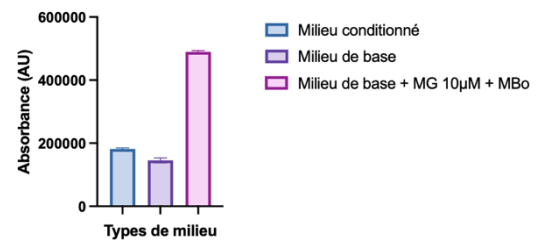
A



B



C



**Figure 16 : Étude du milieu conditionné par les 4T1.** (A) Histogrammes de la fluorescence au MBo des 4T1 par cytométrie en flux. De gauche à droite, les cellules 4T1 contrôles non marquées, les 4T1 mises en culture avec du milieu conditionné par des 4T1 marquées au MBo, les 4T1 marquées au MBo. (B) Histogramme comparatif pour la fluorescence au MBo des 4T1 par cytométrie en flux. (C) Graphique comparatif des absorbances du milieu de base, du milieu conditionné par des 4T1 marquées au MBo, du milieu contenant du MG 10 µM et du MBo.

#### IV.4.3. Analyse du milieu de coculture conditionné par les cellules cancéreuses

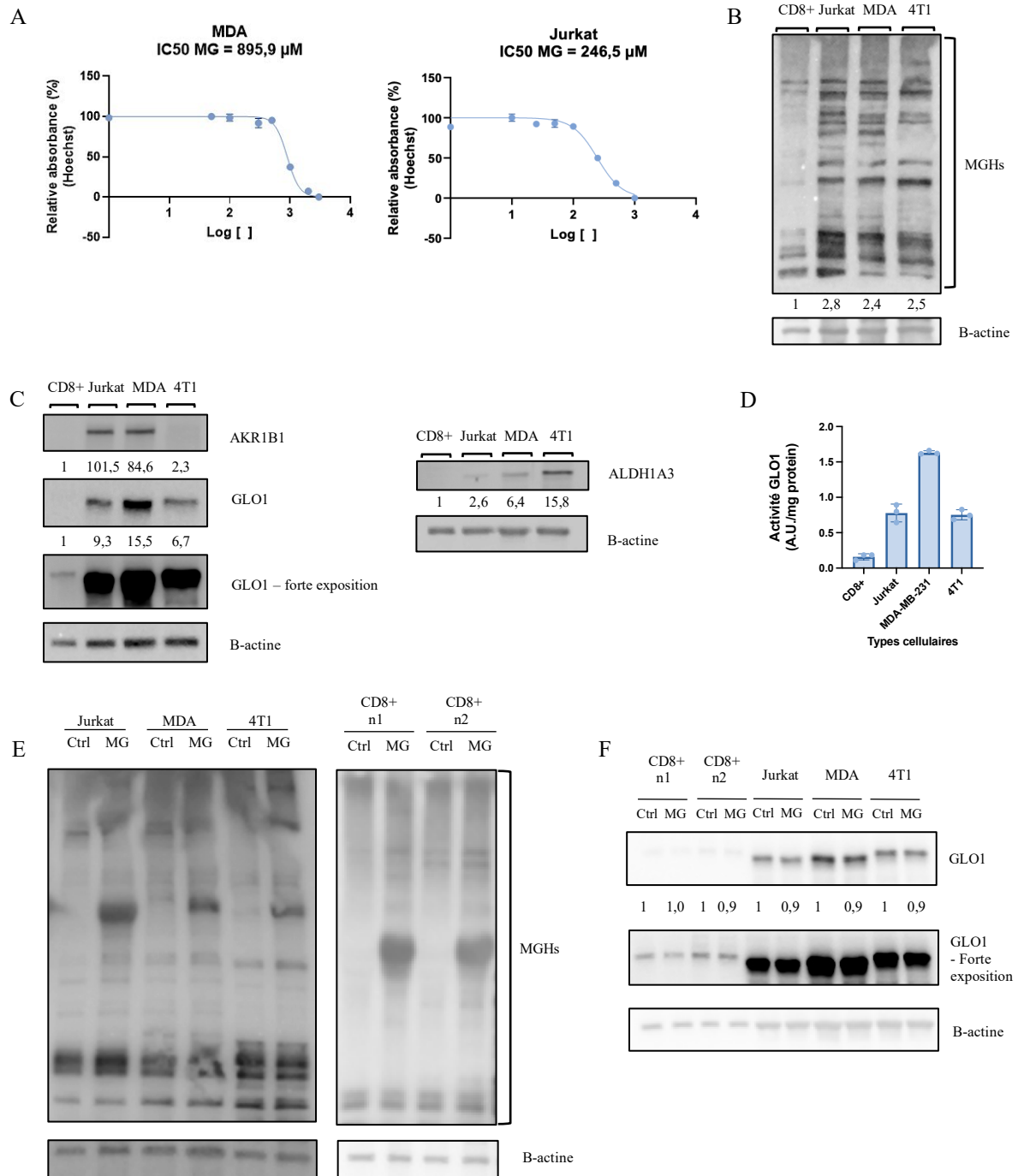
Pour renforcer l'hypothèse de transfert, nous avons étudié la composition du milieu de culture ainsi que la potentielle présence de MBo dans le milieu qui pourrait expliquer la positivité des CD8+ autrement que par un transfert cellulaire.

Pour ce faire, nous avons incubé des cellules 4T1 avec du MBo pendant 2h, puis nous avons réalisé une étape de lavage au PBS afin de retirer tout excès de MBo. Nous avons ensuite ajouté du milieu frais sur ces 4T1 et nous avons laissé ces cellules à l'incubateur pendant une heure. Après cette incubation, nous avons récupéré le milieu conditionné et nous l'avons déposé sur de nouvelles cellules 4T1 qui, elles, n'avaient pas été incubées avec du MBo. Nous avons laissé ces cellules avec le milieu conditionné à l'incubateur pendant une heure puis nous avons récupéré toutes ces cellules pour les analyser au FACS en utilisant la même stratégie de gating que pour les expériences précédentes.

Nous observons que les 4T1 mises en présence du milieu conditionné par les 4T1 marquées au MBo présentent bien un profil différent de celui des 4T1 non marquées utilisées comme contrôle. En effet, nous pouvons observer un décalage du pic vers la droite signifiant une augmentation dans la fluorescence pour les cellules en présence de milieu conditionné (Figure 16A). Cette différence est confirmée par l'histogramme de comparaison (Figure 16B). Cette première expérience nous permet de conclure que les 4T1 mises en présence de MBo ont été capables de relarguer ce dernier dans le milieu de culture et permet de marquer de nouvelles cellules.

Cependant, nous savons au laboratoire que le MG est une petite molécule capable de diffuser à travers les membranes cellulaires <sup>12, 13</sup>. C'est pourquoi une question émerge de cette expérience pour en connaître le mécanisme complet : le MBo libéré par les cellules marquées est-il lié ou non au MG ? Pour répondre à cette question, nous n'utiliserons pas le FACS car il nécessite la présence de cellules mais bien le spectrophotomètre qui nous permet d'analyser la fluorescence d'un milieu. Nous avons analysé l'absorbance du milieu conditionné par rapport à celle du milieu de base ainsi que du milieu dans lequel nous avons ajouté du MG et du MBo comme contrôle. Sur le graphique reprenant les absorbances, nous pouvons voir que l'absorbance du milieu conditionné n'est pas différente de celle du milieu de base, mais présente une grande différence avec celle du milieu supplémenté en MG et en MBo (Figure 16C). En conclusion, les cellules 4T1 sont capables de relarguer du MBo libre, non lié au MG, qui est capable à son tour de marquer d'autres cellules.

Pourtant, nos résultats précédents démontrent que le fait d'avoir une membrane qui sépare physiquement les cellules en présence, autorisant tout de même le partage de milieu entre les deux types cellulaires, empêche le marquage des CD8+ par le MBo. En conclusion, ces expériences suggèrent que même si du



**Figure 17 : Caractérisation des niveaux de base du MG stress et défenses anti-MG chez les lymphocytes et les cellules cancéreuses.** (A) Graphiques représentant les valeurs d'IC50 après 48h de traitement pour les MDA-MB-231 à gauche et les Jurkat à droite. (B) Western blot représentatif des MGHs pour les CD8+ isolés de rate, les Jurkat, les MDA-MB-231 et les 4T1, normalisé et quantifié avec la B-actine. (C) Western blots représentatifs des enzymes de détoxification AKR1B1, GLO1 et ALDH1A3, normalisés et quantifiés avec la B-actine. (D) Graphique représentant les valeurs d'activité enzymatique de GLO1 pour les CD8+ isolés de rate, les Jurkat, les MDA-MB-231 et les 4T1, normalisées par rapport à la quantité de protéine en mg. (E) Western blots représentatif des MGHs pour les CD8+ isolés de rate (contrôle ou traité 70  $\mu$ M), les Jurkat (contrôle ou traité 100  $\mu$ M), les MDA-MB-231 (contrôle ou traité 450  $\mu$ M) et les 4T1 (contrôle ou traité 300  $\mu$ M), normalisé avec la B-actine. (F) Western blot représentatif de l'enzyme GLO1 pour les CD8+ isolés de rate (contrôle ou traité 70  $\mu$ M), les Jurkat (contrôle ou traité 100  $\mu$ M), les MDA-MB-231 (contrôle ou traité 450  $\mu$ M) et les 4T1 (contrôle ou traité 300  $\mu$ M), normalisé et quantifié avec la B-actine.

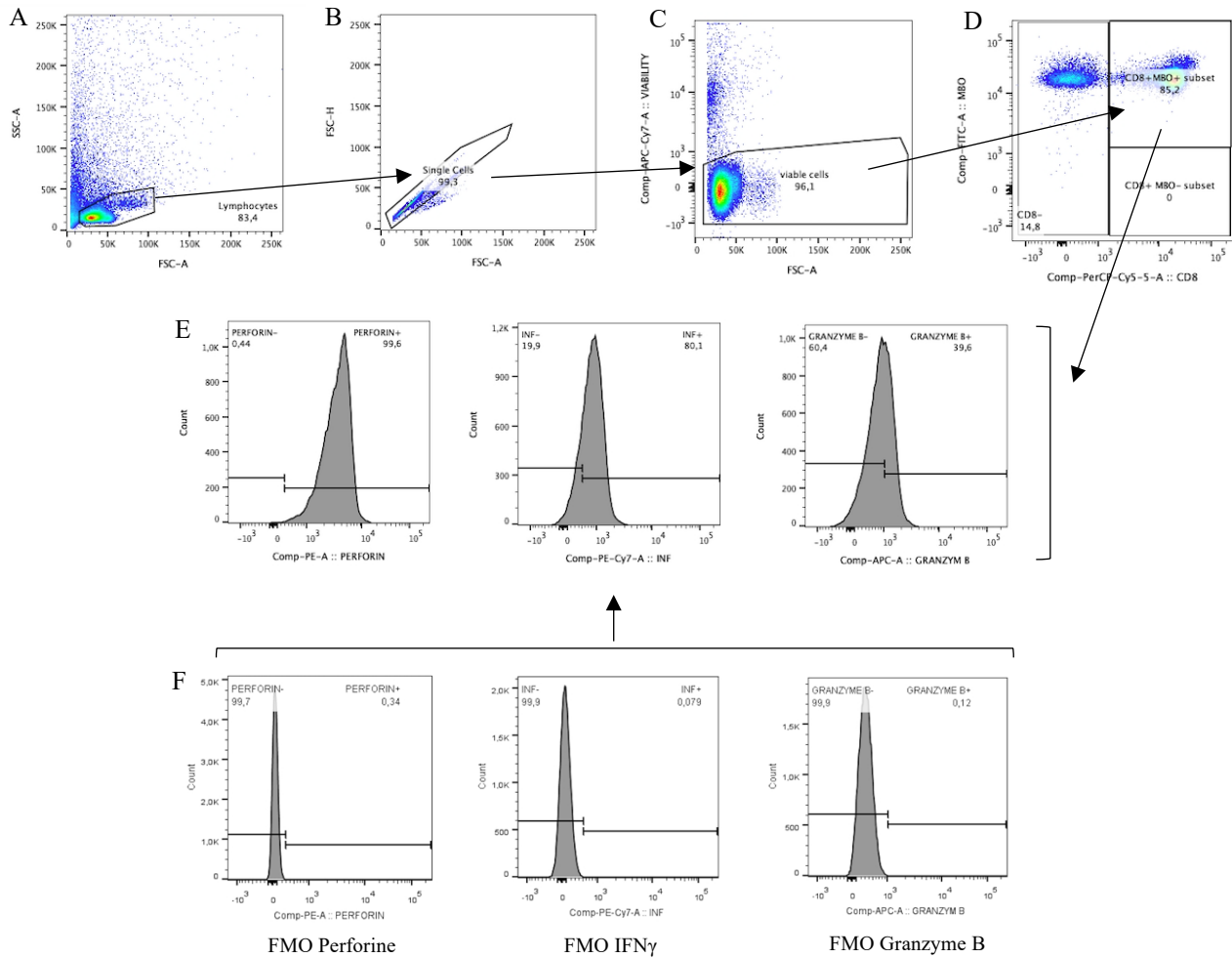
MBo est relargué dans le milieu de coculture, ce n'est pas lui qui est responsable de la positivité des CD8+, renforçant ainsi l'importance du contact intercellulaire.

#### IV.5. Caractérisation des niveaux de base du MG stress et défenses anti-MG chez les lymphocytes et les cellules cancéreuses

Nous avons effectué des tests d'IC50 qui nous permettent d'évaluer la concentration d'un traitement capable de tuer 50% des cellules d'intérêt. Grâce à ce test nous pourrions d'une part évaluer la sensibilité des différentes cellules face au MG, et d'autre part de déterminer une concentration à laquelle nous pourrions traiter les cellules dans des expériences futures. Cette concentration sera estimée en utilisant la moitié de l'IC50. Pour les MDA-MB-231, nous obtenons une IC50 égale à 895,9  $\mu$ M. Pour les Jurkat, l'IC50 calculée vaut 246,5  $\mu$ M (Figure 17A) et l'IC50 des 4T1 est égale à 600  $\mu$ M après 48h de traitement. Il apparaît donc en comparant ces valeurs que les Jurkat soient les plus sensibles au MG. En ce qui concerne les CD8+ isolés de rates, nous ne sommes pas parvenus à maintenir ces cellules en culture plus de 24h, tel que nous sommes capables de le faire pour les lignées cellulaires. Il était alors difficile de réaliser un test d'IC50 sur plusieurs jours.

Pour traiter les cellules au MG, nous utiliserons donc des concentrations de 450  $\mu$ M pour les MDA-MB-231, 300  $\mu$ M pour les 4T1 et 100  $\mu$ M pour les Jurkat. Et pour les CD8+, n'ayant pas de données d'IC50, nous avons considéré de les traiter sur base de la valeur d'IC50 des Jurkat puisqu'il s'agit aussi de lymphocytes. Par précaution, nous utiliserons une concentration de 70  $\mu$ M pour les CD8+ en tenant compte qu'ils sont fragilisés par la procédure d'isolement.

Ensuite, nous avons caractérisé les niveaux de base de stress MG dans chacune des cellules d'intérêt grâce à un Western blot ciblant une des principales classes d'adduits du MG : les MGHs. Nous pouvons observer dans toutes les cellules la présence d'adduits qui confirment donc qu'elles sont capables de former du MG et que ce MG est bien un composé réactif avec les protéines cellulaires. Après quantification, nous pouvons voir que les CD8+ sont les cellules qui possèdent le moins d'adduits MGHs, et les Jurkat en présentent le plus (Figure 17B). En regardant attentivement, nous pouvons aussi constater qu'entre les différents types de cellules, les bandes qui apparaissent ne sont pas identiques ni de même intensité, soulignant que les adduits générés par le MG ne sont pas identiques ni en proportions égales en fonction des types cellulaires. Après les niveaux de base des MGHs, nous avons caractérisé les niveaux de base de certaines enzymes de détoxification. Tout d'abord, nous avons regardé les niveaux de la principale enzyme de détoxification, GLO1. Nous pouvons observer que les MDA-MB-231 sont celles qui expriment le plus cette enzyme (Figure 17C). Nous avons également évalué les niveaux d'expression d'autres enzymes comme les ALDHs et les AKRs. Nous avons analysé deux isoformes à l'aide d'anticorps spécifiques: AKR1B1 et ALDH1A3. Seules les cellules Jurkat et les MDA-MB-231 expriment des niveaux détectables de l'enzyme AKR1B1 (Figure 17C). Concernant ALDH1A3, les 4T1



**Figure 18 : Stratégie de gating des lymphocytes CD8+ pour l'étude fonctionnelle grâce au FACS.** La stratégie commence par le dot plot FSC/SSC avec la sélection de la population de lymphocytes (A). Avec le graphique FSC-A/FSC-H, les doublets sont exclus (B). Parmi la population de singulets, le dot plot FSC-A/Zombie NIR permet la sélection de la population de lymphocytes vivants (C). Au sein des lymphocytes vivants, le dot plot biparamétrique CD8/MBo permet la sélection des différentes populations de CD8+ positives ou non au MBo (D). Les CD8+ sont ensuite analysés en histogrammes pour les paramètres perforine, IFN $\gamma$  et granzyme B (E) dont les seuils ont été établis grâce aux échantillons FMO pour chacun des paramètres fonctionnels (F).



semblent être celles qui en expriment le plus et nous ne détectons pas l'expression de cette protéine au niveau des CD8<sup>+</sup> (Figure 17C).

En plus du niveau d'expression de l'enzyme GLO1, nous avons réalisé une expérience d'activité enzymatique. Nous avons comparé la valeur d'activité enzymatique pour nos 4 types de cellules. L'activité enzymatique enregistrée la plus haute est celle des MDA-MB-231 et vaut en moyenne 1,6 A.U/mg de protéine. L'activité de GLO1 chez les Jurkat et les 4T1 est intermédiaire et se situe entre 0,7 et 0,8 A.U/mg. En revanche, l'activité la plus faible est attribuée aux CD8<sup>+</sup> et vaut approximativement 0,2 A.U/mg (Figure 17D).

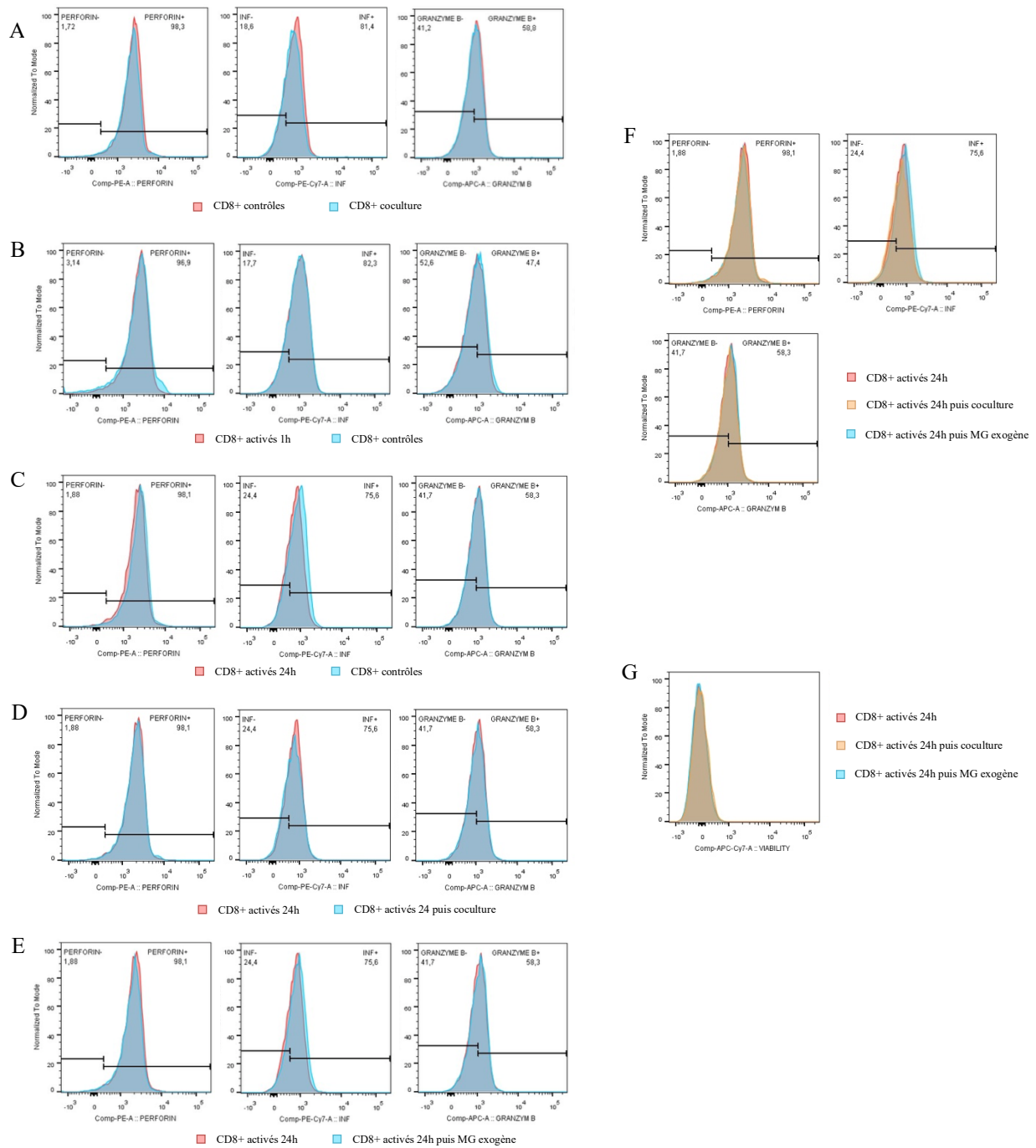
Pour terminer, nous avons traité les différentes cellules avec du MG pendant 2h pour en évaluer l'impact grâce au Western blot pour la détection des adduits protéiques formés en situation de stress du MG. Nous pouvons constater une augmentation générale des adduits du MG pour toutes les cellules traitées au MG, par rapport au contrôle, avec certaines protéines glyquées spécifiques dont l'accumulation est plus élevée que d'autres (Figure 17E). Ce traitement au MG montre que l'ajout de MG exogène augmente la formation d'adduits par les cellules. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de ce traitement sur l'expression de GLO1. Nous pouvons observer qu'un traitement court (2h) au MG n'induit pas de modifications de l'expression de GLO1 au niveau des cellules analysées (Figure 17F).

## IV.6. Conséquences fonctionnelles du transfert de méthylglyoxal des cellules cancéreuses aux lymphocytes

Maintenant que nous avons des raisons de penser que les cellules cancéreuses peuvent transférer du MG aux lymphocytes mais qu'en plus de ça, ces lymphocytes ne semblent pas être pleinement armés pour se défendre contre ce stress, nous voulions étudier l'impact qu'aurait ce transfert sur ces lymphocytes.

### IV.6.1. Stratégie de marquage et de gating des lymphocytes

Une fois de plus, nous utiliserons le FACS pour étudier l'objectif final de ce projet. Avant de commencer, il faut donc établir une nouvelle stratégie de gating. La première gate formée est celle regroupant la population de lymphocytes, réalisée à nouveau sur base de la petite taille des lymphocytes sur le dot plot SSC/FSC (Figure 18A). Ensuite, nous éliminons les potentiels doublets grâce au graphique FSC-H/FSC-A (Figure 18B). Après cela, nous évaluons la viabilité de ces lymphocytes à l'aide du Zombie NIR : la négativité à ce marqueur étant une preuve de la viabilité des cellules (Figure 18C). Dans la population de lymphocytes vivants, nous évaluons la proportion de CD8<sup>+</sup> positifs au MBo, représentant les lymphocytes ayant reçu du MG (Figure 18D). Enfin, au sein de cette dernière sous-population, nous allons étudier des paramètres fonctionnels comme la perforine, le granzyme-B et l'IFN $\gamma$  (Figure 18E). Les seuils de positivité des paramètres fonctionnels ont été placés grâce aux histogrammes obtenus avec les échantillons FMO (*Full Minus One*) (Figure 18F). Tous ces marqueurs



**Figure 19 : Conséquences du MG sur le profil fonctionnel et la viabilité des CD8+.** Histogrammes pour la perforine, l'IFN- $\gamma$  et le granzyme B comparant l'activation (A) après une 1h ou (B) après 24h des CD8+ par rapport aux CD8+ contrôles, par cytométrie en flux. Histogrammes pour la perforine, l'IFN- $\gamma$  et le granzyme B comparant (C) les CD8+ activés 24h mis en coculture ou (D) traités avec du MG exogène par rapport aux CD8+ activés 24h contrôles. (E) Histogramme comparatif pour la perforine, l'IFN- $\gamma$  et le granzyme B des CD8+ activés 24h par cytométrie en flux. (F) Histogrammes pour la perforine, l'IFN- $\gamma$  et le granzyme B comparant les CD8+ non activés contrôles avec les CD8+ non activés mis en coculture, par cytométrie en flux. (G) Histogramme comparatif pour la fluorescence au Zombie NIR des CD8+ par cytométrie en flux.

nous permettront d'évaluer si le transfert de MG impacte la viabilité et/ou les fonctions effectrices des lymphocytes.

#### IV.6.2. Étude des conséquences fonctionnelles du transfert de méthylglyoxal chez les lymphocytes

Pour connaître les conséquences du transfert de MG chez les lymphocytes, nous avons d'abord comparé les CD8<sup>+</sup> contrôles avec les CD8<sup>+</sup> mis en coculture pour voir si on observait ou non une diminution de l'expression basale des facteurs fonctionnels à savoir l'IFN $\gamma$ , la perforine et le granzyme B. Dans ces conditions, nous n'avons observé aucun changement en comparant les différents histogrammes (Figure 19A).

Par ailleurs, dans l'article de Baumann et al.<sup>72</sup>, ils étudient l'impact du transfert de MG sur des lymphocytes qui ont été préalablement activés avant la coculture. En procédant ainsi, ils ont pu constater une diminution de la sécrétion de cytokines et granzyme B après la coculture avec des MDSCs. Dans cette optique, nous avons entrepris d'activer les CD8<sup>+</sup> isolés et d'évaluer ensuite l'impact de la coculture avec les cellules 4T1.

Tout d'abord, nous avons essayé d'activer les CD8<sup>+</sup> en les incubant une heure avec des billes d'activation CD3/CD28 puisque le protocole partagé par le fournisseur du kit d'activation ne donnait pas de durée d'incubation précise. Malheureusement, ce temps d'incubation n'a pas permis d'activer les CD8<sup>+</sup> puisque nous n'avons vu aucun changement dans les profils d'expression des CD8<sup>+</sup> avant et après incubation avec les billes (Figure 19B). Par la suite, nous avons suivi un protocole qui nous a été recommandé, et procédé à une incubation de 24h avec les billes d'activation. Hélas, en comparant les profils de CD8<sup>+</sup> incubés 24h avec les billes avec ceux des CD8<sup>+</sup> contrôles, nous n'observons à nouveau aucune différence pour la détection des cytokines ou de granzyme B (Figure 19C).

Pour être certains de n'avoir raté aucune information, nous avons tout de même comparé certaines populations afin de déceler de potentiels changements. Par exemple, nous avons comparé les profils fonctionnels des CD8<sup>+</sup> « activés » par rapport aux CD8<sup>+</sup> « activés » récupérés après coculture. Au vu des résultats de Baumann et al.<sup>72</sup>, nous nous attendions à voir une diminution de leur sécrétion de cytokines ou granzyme B. Cependant, les graphiques sont semblables pour les deux populations, aucune diminution apparente pour les CD8<sup>+</sup> mis en coculture après « activation » (Figure 19D).

Ensuite, en plus de l'aspect coculture, il nous paraissait intéressant de vérifier si l'effet observé après coculture pouvait être comparable avec un traitement exogène des CD8<sup>+</sup> au MG. Mais de la même façon ici, nous n'avons pas pu observer de différences entre les CD8<sup>+</sup> « activés » et les CD8<sup>+</sup> « activés » traités au MG (Figure 19E), ni même avec la population de CD8<sup>+</sup> « activés » issus de la coculture (Figure 19F). Toutes ces données montrent que, malgré une incubation de 24h avec les billes

d'activation, nous ne sommes pas parvenus à activer les CD8<sup>+</sup> isolés, ce qui a, par conséquent, probablement compromis nos observations.

Pour finir, nous avons comparé les différentes populations en termes de viabilité afin de compléter cette étude. Nous avons effectué les mêmes comparaisons de populations qu'avec les profils fonctionnels et de ce côté-là, une fois de plus, nous n'avons pas remarqué de diminution de la viabilité chez les CD8<sup>+</sup> venant de coculture ou traités au MG par rapport à des CD8<sup>+</sup> contrôles (Figure 19G).

Tous ces résultats ne permettent pas de mettre en évidence une influence quelconque du transfert, ni même d'ajout, de MG sur la fonction et la viabilité des CD8<sup>+</sup>.

## V. Discussion

Le microenvironnement tumoral apparaît comme une notion importante émergente dans le contexte du cancer. En effet, à l'heure actuelle, de nombreuses études ne s'attardent plus uniquement à comprendre comment fonctionnent les cellules cancéreuses au sens strict, mais tentent de comprendre comment interagissent les cellules qui composent ce microenvironnement et comment elles contribuent ensemble à la progression cancéreuse et métastatique. Dans ce microenvironnement, les cellules immunitaires jouent un rôle crucial soit en étant pro-tumorales, soit en étant anti-tumorales en fonction de la composition de cet environnement et du type de cellules immunitaires en présence. Une population immunitaire importante est celle des TILs puisque parmi ces lymphocytes, on retrouve les premières lignes de défenses contre les cellules tumorales comme les lymphocytes T CD8+. Une notion supplémentaire est à prendre en compte puisque ces cellules anti-tumorales peuvent subir différentes atteintes qui vont impacter leur activité et devenir ce qu'on appelle des « *exhausted T cells* » et par conséquent devenir incapables d'assurer leur fonction, laissant ainsi l'opportunité aux cellules tumorales de progresser.

L'équipe de Baumann et al.<sup>72</sup> s'est intéressée à ce concept en étudiant l'effet de cocultures entre des MDSCs, qui sont des cellules immunosuppressives, et des lymphocytes CD8+. Ils ont pu prouver que ces MDSCs paralysaient les CD8+ par un transfert intercellulaire de MG, qui lui-même entravait les mécanismes fonctionnels et d'activation propres aux lymphocytes. Nous savons donc que le MG peut avoir un impact sur le fonctionnement des lymphocytes mais nous savons aussi que les cellules tumorales peuvent être particulièrement glycolytiques, dû à l'effet Warburg, menant ainsi à une production de MG. La réflexion qui a émergé de ces éléments de contexte était donc de savoir si les cellules cancéreuses, à l'instar des MDSCs, étaient capables d'un tel transfert vers les lymphocytes et de connaître les conséquences sur ces derniers.

Dans un premier temps, nous avons entrepris de visualiser le transfert grâce à différentes techniques d'imagerie. Nous avons pu observer, pour chaque microscope testé, des lymphocytes devenus positifs au MBo indiquant qu'ils ont donc reçu du MG qui a été formé par les cellules cancéreuses. Cependant, imager ce concept n'a pas été chose aisée. En effet, les lymphocytes sont des cellules qui se cultivent en suspension alors que les cellules cancéreuses utilisées sont adhérentes. Ce qui veut dire que, lorsque les cellules sont mises en coculture, elles se situent d'abord dans des plans différents puisque les cellules adhérentes tendent à se déposer au fond des puits rapidement. Nous avons remarqué qu'au bout de quelques minutes, les lymphocytes commencent à sédimenter, nous permettant seulement à cet instant-là de paramétrer le plan à imager. Sachant qu'au départ, nous trouvions intéressant d'imager ce phénomène en temps réel étant donné que, dans l'article de référence <sup>72</sup>, les auteurs observaient un transfert après 30 minutes, nous espérions voir un transfert se passer à l'image. Toutes ces contraintes nous ont empêché plus d'une fois de lancer rapidement la prise d'image ce qui

fait que les images enregistrées ont toujours été le résultat de demi-heures voire d'heures de coculture. Malgré tout, l'augmentation de ce temps d'observation de coculture a rendu possible la mise en évidence de ce phénomène dans un nombre plus important de lymphocytes. Ces observations soulèvent un point important puisqu'il serait intéressant de quantifier les lymphocytes positifs au MBo à différents temps de coculture afin d'observer ou non une augmentation progressive de transfert de MG à partir de la mise en contact des cellules et de voir si la totalité des lymphocytes serait impactée. De plus, le fait d'avoir testé différents microscopes pour tester notre hypothèse de transfert a permis de réaliser les avantages et les contraintes de chacun d'eux. Celui qui a été le plus simple d'utilisation reste l'Incucyte® malgré son manque de résolution ainsi que les soucis de background qu'il nous a apportés. Les autres microscopes présentent une meilleure résolution mais cet aspect technique amène la difficulté à paramétrer l'image. Ces outils très performants nécessitent sans nul doute un temps d'apprentissage plus long pour en maîtriser toutes les options de réglage offertes. L'Incucyte® serait donc utile pour essayer une quantification en cinétique mais la quantification serait compromise par les signaux de bruit de fond élevés donnant probablement des résultats faussement positifs. Tous ces éléments sont donc à prendre en compte lors de la réalisation d'une expérience en fonction de ce que nous désirons observer. En plus des techniques d'imagerie, l'utilisation de la technique de FACS nous a permis de confirmer le transfert de MG entre les lymphocytes et les cellules cancéreuses et il nous a apporté des informations supplémentaires. En effet, grâce à la coculture faite avec un *transwell*, nous avons pu prouver que le contact intercellulaire était nécessaire pour ce transfert confirmant les observations de notre étude de référence<sup>72</sup>. Nous avons renforcé cette hypothèse en ajoutant à cette expérience l'étude du milieu de coculture conditionné. Nous avons montré que du MBo libre est relargué dans le milieu de coculture par les cellules cancéreuses et nous avons prouvé que ce dernier n'était pas responsable de la positivité au MBo des lymphocytes. Ces observations démontrent bien qu'un transfert ciblé de MG se produit par contact intercellulaire entre les cellules cancéreuses et les lymphocytes.

Ensuite, il est bien établi que la principale source endogène de MG est la glycolyse. Dans les cellules tumorales, un métabolisme glycolytique accru est fréquemment observé. Néanmoins, toutes les tumeurs ne présentent pas un profil glycolytique identique. Certaines cellules parviennent à se maintenir en absence de glucose alors que d'autres semblent fortement dépendantes de cette voie métabolique pour survivre et proliférer, suggérant une hétérogénéité métabolique importante au sein des populations tumorales<sup>84</sup>. Par conséquent, les tumeurs les plus glycolytiques entraîneraient une plus forte production de MG par rapport aux tumeurs les moins glycolytiques. Cet aspect a bien été démontré dans une étude menée par notre laboratoire en comparant les lignées de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF7 et il a été observé que la lignée triple négative MDA-MB-231, glycolytique, produit plus de MG que la lignée luminale MCF7, moins glycolytique<sup>85</sup>. Ainsi, il est raisonnable de penser que les tumeurs les plus glycolytiques génèrent des concentrations plus élevées de MG et qu'elles le maintiennent à un niveau sub-toxique par une détoxification efficace<sup>85</sup>, par rapport aux tumeurs moins dépendantes de cette voie.

Il est donc intéressant de se demander si le mécanisme de transfert de MG pourrait être un phénomène plus spécifique aux tumeurs plutôt glycolytiques. Nous pourrions réaliser nos expériences en utilisant une autre lignée de cancer du sein murin. Par exemple, la lignée cellulaire 67NR, qui est une lignée isogénique de la lignée 4T1 mais qui présente un profil non métastatique. Il a été démontré que la lignée 67NR présentait une activité glycolytique significativement plus faible que celle de la lignée 4T1 <sup>86</sup>. Par conséquent, nous pourrions avoir un modèle de comparaison dans le cancer du sein triple négatif murin d'une lignée cellulaire glycolytique comparée à une autre moins glycolytique. Ce système permettrait d'évaluer les différents niveaux de stress MG et d'approfondir l'étude du processus de transfert associé.

Toutefois, le cancer du sein triple négatif n'est pas le seul type de cancer à présenter un profil immunogénique. En effet, le mélanome est également considéré comme étant une tumeur hautement immunogénique, caractérisée par une forte infiltration lymphocytaire <sup>87</sup>. Il a été démontré que les TILs constituent un facteur pronostique favorable chez les patients atteints de mélanome et que leur évaluation pourrait guider le traitement et la prise en charge <sup>88</sup>. Il serait donc pertinent de reproduire les mêmes investigations dans ce type de cancer afin de déterminer si le mécanisme de transfert de MG observé est spécifique au cancer du sein ou s'il peut également être présent au niveau d'autres types de tumeurs solides. Une telle approche permettrait non seulement de mieux comprendre les interactions immuno-tumorales, mais aussi de mettre en évidence un mécanisme potentiellement commun entre différents types de cancers et intéressant à cibler en thérapie.

Nos résultats préliminaires soulèvent un point de littérature intéressant à discuter ici. L'effet inhibiteur des tumeurs glycolytiques sur la fonction des lymphocytes T a d'abord été démontré au niveau du mélanome <sup>89</sup>. Ces auteurs, utilisant des modèles murins de mélanome, ont montré que la déplétion de la lactate déshydrogénase (LDHA) au niveau de la tumeur conduit à une infiltration massive de celle-ci par les lymphocytes T et les cellules NK. Par la suite, l'effet Warburg lui-même a été décrit comme étant immunosuppresseur, notamment à travers l'accumulation de lactate qui favoriserait un environnement immunosuppresseur (par exemple, MDSCs) aux dépens d'un environnement anti-tumoral (lymphocytes T). Une étude plus récente s'est attachée à élargir ces observations à différents types de tumeurs solides et a validé l'existence d'une corrélation inverse entre le niveau de glycolyse de la tumeur et l'infiltration immunitaire anti-tumorale <sup>90</sup>. En accord avec ces observations, nos résultats préliminaires suggèrent un mécanisme original à travers lequel les cellules cancéreuses glycolytiques produisant du MG induisent une perte de fonction des lymphocytes T. En perspective de ce travail, il serait intéressant de documenter expérimentalement plus en avant la perte de fonction et même la mort des cellules T sous stress du MG. Une approche translationnelle future consisterait à rechercher une corrélation négative significative entre une signature génique du stress MG, déjà établie au laboratoire <sup>49</sup> pour le cancer du sein, et une signature génique permettant d'estimer l'abondance de l'infiltration tumorale par les lymphocytes T CD8+ <sup>90</sup>. Si cette corrélation existe, alors il serait intéressant de proposer que la suppression immunitaire anti-tumorale induite par la glycolyse serait attribuable, à côté du lactate, au

MG produit à la faveur de l'effet Warburg au niveau des tumeurs solides. Dès lors, le blocage du stress MG à l'aide d'agents neutralisants, tels que la carnosine et l'aminoguanidine, pourrait préserver la fonctionnalité des lymphocytes T au niveau des tumeurs glycolytiques et favoriser ainsi la réponse de celles-ci aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires.

Nos résultats ont mis en évidence une sensibilité différente au MG selon le type cellulaire considéré. Plus particulièrement, les cellules lymphocytaires Jurkat apparaissent nettement plus sensibles au MG que les lignées tumorales MDA-MB-231 et 4T1, ce qui suggère une vulnérabilité accrue des lymphocytes face à ce stress. La détection par Western blot des adduits MGHs indique que chaque lignée est capable de former du MG de manière endogène, confirmant la présence constitutive de ce composé réactif. Toutefois, la quantité d'adduits varie, avec une accumulation plus faible dans les cellules T CD8<sup>+</sup> murines et plus élevée au niveau des cellules Jurkat. Cela suggère soit une production plus faible de MG dans les CD8<sup>+</sup>, soit une meilleure capacité à gérer ce stress via des mécanismes de détoxification alternatifs ou plus efficaces. Aussi, nous observons une diversité dans les protéines glyquées par le MG en fonction des types de cellules analysées, ce qui pourrait refléter des profils métaboliques différents ou une réactivité variable du MG avec les protéines exprimées dans chaque type cellulaire, un concept intéressant à explorer à travers des approches telles que la protéomique par spectrométrie de masse. Cela souligne l'importance de ne pas considérer le stress MG comme un processus uniforme, mais plutôt comme spécifique au contexte cellulaire. Concernant la détoxification du MG, nos résultats montrent que les cellules MDA-MB-231 expriment les plus hauts niveaux de GLO1, enzyme clé du système glyoxalase, tandis que les Jurkat et les 4T1 montrent un niveau intermédiaire et que les CD8<sup>+</sup> semblent en exprimer très peu. Toutefois, le niveau d'expression seul ne suffit pas à évaluer la capacité de détoxification, c'est pourquoi nous avons mesuré l'activité enzymatique de GLO1. Cette dernière est la plus élevée au niveau des cellules MDA-MB-231, intermédiaire chez les Jurkat et 4T1, et nettement plus faible chez les CD8<sup>+</sup>. Ces résultats soulignent une corrélation entre expression et activité enzymatique, et mettent en évidence l'intérêt d'analyser ces deux paramètres pour mieux comprendre les capacités de détoxification. Le profil des CD8<sup>+</sup> pourrait refléter une dépendance réduite à la glycolyse ou une tolérance accrue au MG via d'autres mécanismes de compensation. L'évaluation d'enzymes alternatives de détoxification du MG, comme AKR1B1 et ALDH1A3, renforce cette idée d'hétérogénéité. Alors que les Jurkat et les MDA-MB-231 expriment AKR1B1, ALDH1A3 est majoritairement exprimée dans les 4T1, et absente chez les CD8<sup>+</sup>. Ces résultats suggèrent que chaque lignée développe un profil de détoxification propre, probablement adapté à son métabolisme et à son microenvironnement spécifique.

Le traitement exogène au MG dans nos expériences a permis de confirmer la capacité des cellules à augmenter la formation d'adduits MGHs, mais n'a pas permis d'observer de modulation de GLO1 à court terme. Il serait donc pertinent de prolonger ces traitements pour explorer la réponse adaptative à plus long terme comme cela a déjà été démontré dans le laboratoire ou d'analyser le niveau



des ARN messagers de GLO1<sup>85</sup>. Il serait également intéressant d'évaluer l'adaptation de l'activité enzymatique de GLO1 dans ces mêmes conditions. En conclusion, ces résultats montrent que les CD8<sup>+</sup> se distinguent nettement des autres lignées par leur faible accumulation d'adduits, leur faible expression et activité de GLO1, et l'absence d'expression détectable d'enzymes de compensation. Ce profil soulève des questions sur la vulnérabilité potentielle des lymphocytes CD8<sup>+</sup> face au stress MG et mérite d'être exploré plus en détail, notamment dans des contextes tumoraux où le MG est produit en excès. Bien que ces expériences nécessitent d'être répétées, ces résultats préliminaires mettent en évidence l'intérêt d'approfondir les différences observées entre les lymphocytes et les cellules tumorales en termes de gestion du stress MG.

Finalement, ces résultats soulèvent naturellement la question des conséquences fonctionnelles d'un stress MG accru dans l'environnement tumoral, en particulier sur les lymphocytes T et dans notre cas, causé par le transfert intercellulaire de MG par les cellules tumorales. Alors que les résultats publiés par Baumann et al.<sup>72</sup>, rapportent une altération fonctionnelle des lymphocytes T en coculture avec les MDSCs, les conditions dans lesquelles nous avons effectué nos expériences n'ont pas permis de reproduire cette observation. En effet, nous ne sommes pas parvenus à induire l'activation des lymphocytes T afin d'évaluer leur éventuelle perte de fonction sous MG. Nous pouvons néanmoins émettre des hypothèses quant aux facteurs ayant pu empêcher l'activation des lymphocytes entre nos mains. L'hypothèse la plus plausible est celle du temps d'incubation avec les billes d'activation. En effet, une période de 24h d'incubation semble trop courte pour observer une activation mesurable. En parcourant les protocoles de divers kits d'activation disponibles dans le commerce, nous avons constaté que certains recommandent une incubation pouvant durer jusqu'à 3 jours<sup>91,92</sup>. Nous pourrions également ajouter un contrôle d'activation dans notre panel de marquage au FACS. Effectivement, lors de leur activation, les lymphocytes expriment certains marqueurs tels que le CD69<sup>93</sup>. Mesurer ce marqueur nous permettrait d'évaluer, avant l'expression de cytokines, si la manipulation d'activation a fonctionné.

Si nous nous appuyons sur ce qui est décrit dans la littérature, en plus des résultats de Baumann<sup>72</sup>, il n'est pas déraisonnable de penser que le MG pourrait contribuer à l'inhibition fonctionnelle des lymphocytes T. En effet, une étude menée en 2010<sup>94</sup> a démontré que le MG pouvait être un agent immunosuppresseur des lymphocytes T puisqu'un traitement au MG a entraîné l'inhibition de leur production de cytokines comme l'IFN- $\gamma$ . Ce potentiel effet immunosuppresseur du MG s'inscrit dans un paysage déjà bien documenté d'inhibition des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral, où l'épuisement de ces derniers peut résulter de multiples signaux extrinsèques<sup>95</sup>. Parmi ces facteurs, les Treg, mentionnés précédemment, sécrètent des cytokines immunosuppressives comme le TGF- $\beta$  et l'IL-10<sup>96</sup>. Ensuite, les MDSCs produisent de l'ARG-1 (arginase 1) capable d'entraver la réponse aux antigènes en diminuant la synthèse de la chaîne  $\zeta$  du CD3<sup>97</sup>, ou encore des ROS (*reactive oxygen species*) qui causeront un stress oxydatif aux lymphocytes cibles<sup>98</sup>. Les MDSCs, tout comme les cellules tumorales<sup>99</sup>, produisent aussi l'enzyme IDO qui catalyse la dégradation du tryptophane en

kynurénine qui peut inhiber l'expansion clonale par la déplétion du tryptophane essentiel pour les cellules T et par la formation de kynurénine immunosuppressive<sup>100</sup>. À l'instar des autres cellules dans cet environnement, les TAMs sécrètent du TGF- $\beta$  et de l'IL-10 mais aussi des ROS, qui vont induire le dysfonctionnement des lymphocytes. Les TAMs altèrent aussi le fonctionnement des cellules T en déplaçant le milieu d'acides aminés importants pour ces cellules comme la L-arginine ou, à nouveau, le tryptophane<sup>101</sup>. L'ensemble de ces mécanismes, bien que non exhaustifs, contribue à inhiber la prolifération et les fonctions effectrices des cellules T, ainsi qu'à altérer leur réponse aux antigènes et leur activation, conduisant progressivement à leur épuisement et, par conséquent, à un affaiblissement des défenses immunitaires anti-tumorales. Dès lors, le transfert de MG des cellules cancéreuses aux lymphocytes T pourrait représenter un nouveau mécanisme original et direct d'immunosuppression.

De manière intéressante, le MG se distingue des autres mécanismes par son potentiel en tant que cible thérapeutique à double effet. En effet, plusieurs études ont mis en évidence les effets antitumoraux de la carnosine à travers sa capacité à neutraliser le MG au niveau de différents types de tumeurs<sup>49,102,103</sup>. Cela suggère qu'un même traitement pourrait cibler d'une part, les cellules tumorales (en réduisant le stress MG) et d'autre part, restaurer les défenses immunitaires anti-tumorales, en particulier celles des lymphocytes T infiltrants. Cette approche n'est pas sans rappeler celle de Baumann et al.<sup>72</sup> qui a utilisé, avec succès, la metformine pour contrer la suppression des lymphocytes T. Ainsi, dans l'ensemble, nos observations ouvrent la voie à de nouvelles perspectives expérimentales.

## VI. Conclusion et perspectives

En conclusion, ce mémoire nous a permis de montrer qu'un transfert de MG est possible des cellules cancéreuses aux lymphocytes. Par conséquent, les informations apportées par ce mémoire ainsi que les informations précédemment apportées par l'étude de Baumann<sup>72</sup> ouvrent une nouvelle dimension pour les recherches sur le MG et les conséquences du stress qu'il engendre. En effet, il s'avère que cette molécule réactive n'impacte pas uniquement les cellules cancéreuses mais touche aussi des cellules du microenvironnement tumoral, à savoir les lymphocytes, acteurs clés de l'immunité anti-tumorale. En améliorant notre méthodologie d'analyse fonctionnelle des lymphocytes T, il serait possible de montrer que ce transfert impacte réellement leur activité, révélant ainsi le stress MG comme une nouvelle cible potentielle pour améliorer l'immunité anti-tumorale. Une perspective expérimentale intéressante dans la continuité de ce projet de mémoire pourrait être l'utilisation de scavengers du MG sur une coculture de cellules cancéreuses et de lymphocytes afin d'en évaluer l'impact sur les deux populations cellulaires. La neutralisation du stress MG pourrait apparaître comme une stratégie thérapeutique « d'une pierre deux coups » innovante : limiter le potentiel agressif des cellules cancéreuses tout en stimulant la défense immunitaire de l'hôte médiée par les lymphocytes.

## VII. Bibliographie

1. Katsura C, Ogunmwonyi I, Kankam HK, Saha S. Breast cancer: presentation, investigation and management. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2022;83(2):1-7. doi:10.12968/hmed.2021.0459
2. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093
3. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*. 2020; 84:106535. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106535
4. Valenza C, Taurelli Salimbeni B, Santoro C, Trapani D, Antonarelli G, Curigliano G. Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment. *Cancers (Basel)*. 2023;15(3):767. Published 2023 Jan 26. doi:10.3390/cancers15030767
5. Popovic LS, Matovina-Brko G, Popovic M, Punie K, Cvetanovic A, Lambertini M. Targeting triple-negative breast cancer: A clinical perspective. *Oncol Res*. 2023;31(3):221-238. Published 2023 May 24. doi:10.32604/or.2023.028525
6. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-1033. doi:10.1126/science.1160809
7. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(10):669-680. doi:10.1038/s41568-021-00378-6
8. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008;13(6):472-482. doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.005
9. Brault C, Schulze A. The Role of Glucose and Lipid Metabolism in Growth and Survival of Cancer Cells. *Recent Results Cancer Res*. 2016; 207:1-22. doi:10.1007/978-3-319-42118-6\_1
10. Bellahcène A, Nokin MJ, Castronovo V, Schalkwijk C. Methylglyoxal-derived stress: An emerging biological factor involved in the onset and progression of cancer. *Semin Cancer Biol*. 2018; 49:64-74. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.05.010
11. Thornalley PJ. The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med*. 1993;14(4):287-371. doi:10.1016/0098-2997(93)90002-u
12. Lai SWT, Lopez Gonzalez EJ, Zoukari T, Ki P, Shuck SC. Methylglyoxal and Its Adducts: Induction, Repair, and Association with Disease. *Chem Res Toxicol*. 2022;35(10):1720-1746. doi: 10.1021/acs.chemrestox.2c00160
13. Rabbani N, Xue M, Thornalley PJ. Methylglyoxal-induced dicarbonyl stress in aging and disease: first steps towards glyoxalase 1-based treatments. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(19):1677-1696. doi:10.1042/CS20160025

14. Muthyalaiyah YS, Jonnalagadda B, John CM, Arockiasamy S. Impact of Advanced Glycation End products (AGEs) and its receptor (RAGE) on cancer metabolic signaling pathways and its progression. *Glycoconj J*. 2021;38(6):717-734. doi:10.1007/s10719-021-10031-x
15. Berends E, van Oostenbrugge RJ, Foulquier S, Schalkwijk CG. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, as a threat for blood brain barrier integrity. *Fluids Barriers CNS*. 2023;20(1):75. Published 2023 Oct 24. doi:10.1186/s12987-023-00477-6
16. Phillips SA, Thornalley PJ. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem*. 1993;212(1):101-105. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17638.x
17. Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-Related Diseases. *Physiol Rev*. 2020;100(1):407-461. doi:10.1152/physrev.00001.2019
18. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*. 1999;344 Pt 1(Pt 1):109-116.
19. Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(12):1708-1716. doi:10.1016/s0891-5849(00)00228-8
20. Lyles GA, Chalmers J. The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem Pharmacol*. 1992;43(7):1409-1414. doi:10.1016/0006-2952(92)90196-p
21. Reichard GA Jr, Skutches CL, Hoeldtke RD, Owen OE. Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. *Diabetes*. 1986;35(6):668-674. doi:10.2337/diab.35.6.668
22. Maasen K, Scheijen LJ, Opperhuizen A, Stehouwer CDA, Van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG. Quantification of dicarbonyl compounds in commonly consumed foods and drinks; presentation of a food composition database for dicarbonyls [published correction appears in *Food Chem*. 2021 May 15; 344:128578. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128578.]. *Food Chem*. 2021; 339:128063. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128063
23. Baskaran S, Rajan DP, Balasubramanian KA. Formation of methylglyoxal by bacteria isolated from human faeces. *J Med Microbiol*. 1989;28(3):211-215. doi:10.1099/00222615-28-3-211
24. Tötemeyer S, Booth NA, Nichols WW, Dunbar B, Booth IR. From famine to feast: the role of methylglyoxal production in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1998;27(3):553-562. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00700.x
25. Rabbani N, Thornalley PJ. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nat Protoc*. 2014;9(8):1969-1979. doi:10.1038/nprot.2014.129

26. Morgenstern J, Campos Campos M, Nawroth P, Fleming T. The Glyoxalase System-New Insights into an Ancient Metabolism. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(10):939. Published 2020 Oct 1. doi:10.3390/antiox9100939
27. Alhujaily M. Molecular Assessment of Methylglyoxal-Induced Toxicity and Therapeutic Approaches in Various Diseases: Exploring the Interplay with the Glyoxalase System. *Life (Basel)*. 2024;14(2):263. Published 2024 Feb 17. doi:10.3390/life14020263
28. Thornalley PJ, Rabbani N. Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(3):318-325. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.02.006
29. Vander Jagt DL, Hunsaker LA. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact*. 2003;143-144:341-351. doi:10.1016/s0009-2797(02)00212-0
30. Penning TM. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact*. 2015; 234:236-246. doi: 10.1016/j.cbi.2014.09.024
31. Morgenstern J, Fleming T, Schumacher D, et al. Loss of Glyoxalase 1 Induces Compensatory Mechanism to Achieve Dicarbonyl Detoxification in Mammalian Schwann Cells. *J Biol Chem*. 2017;292(8):3224-3238. doi:10.1074/jbc.M116.760132
32. Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem*. 1994;269(51):32299-32305.
33. Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CA, Thornalley PJ. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem J*. 2002;364(Pt 1):1-14. doi:10.1042/bj3640001
34. Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch Biochem Biophys*. 1997;344(1):29-36. doi:10.1006/abbi.1997.0195
35. Oya T, Hattori N, Mizuno Y, et al. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J Biol Chem*. 1999;274(26):18492-18502. doi:10.1074/jbc.274.26.18492
36. Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J*. 1997;324 (Pt 2) (Pt 2):565-570. doi:10.1042/bj3240565

37. Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem*. 1998;273(30):18714-18719. doi:10.1074/jbc.273.30.18714
38. Lederer MO, Klaiber RG. Cross-linking of proteins by Maillard processes: characterization and detection of lysine-arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorg Med Chem*. 1999;7(11):2499-2507. doi:10.1016/s0968-0896(99)00212-6
39. Li Y, Cohenford MA, Dutta U, Dain JA. The structural modification of DNA nucleosides by nonenzymatic glycation: an in vitro study based on the reactions of glyoxal and methylglyoxal with 2'-deoxyguanosine. *Anal Bioanal Chem*. 2008;390(2):679-688. doi:10.1007/s00216-007-1682-4
40. Shuck SC, Wuenschell GE, Termini JS. Product Studies and Mechanistic Analysis of the Reaction of Methylglyoxal with Deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol*. 2018;31(2):105-115. doi:10.1021/acs.chemrestox.7b00274
41. Bathaie SZ, Bahmani F, Farajzadeh A. Role of amino acids on prevention of nonenzymatic glycation of lens proteins in senile and diabetic cataract. In: Elsevier eBooks.; 2014:141-155. doi:10.1016/b978-0-12-401717-7.00015-0
42. Pepper ED, Farrell MJ, Nord G, Finkel SE. Antiglycation effects of carnosine and other compounds on the long-term survival of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(24):7925-7930. doi:10.1128/AEM.01369-10
43. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419(1):31-40. doi:10.1016/j.abb.2003.08.013
44. Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwergold BS. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999;48(1):198-202. doi:10.2337/diabetes.48.1.198
45. Peters AS, Wortmann M, Fleming TH, et al. Effect of metformin treatment in patients with type 2 diabetes with respect to glyoxalase 1 activity in atherosclerotic lesions. *Vasa*. 2019;48(2):186-192. doi:10.1024/0301-1526/a000762
46. Sakamoto H, Mashima T, Yamamoto K, Tsuruo T. Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *J Biol Chem*. 2002;277(48):45770-45775. doi:10.1074/jbc.M207485200
47. Crake R, Gasmi I, Dehay J, et al. Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Cancer Is Connected to Methylglyoxal Stress and Heat Shock Response. *Cells*. 2023;12(10):1414. Published 2023 May 17. doi:10.3390/cells12101414
48. Nokin MJ, Durieux F, Peixoto P, et al. Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 glycation and YAP-mediated tumor growth and metastasis [published correction appears in *Elife*. 2024 Feb 06;13: e96613. doi: 10.7554/eLife.96613.] [published correction appears in

- Elife. 2024 Sep 23;13: e103327. doi: 10.7554/eLife.103327.]. Elife. 2016;5: e19375. Published 2016 Oct 19. doi:10.7554/eLife.19375
49. Nokin MJ, Bellier J, Durieux F, et al. Methylglyoxal, a glycolysis metabolite, triggers metastasis through MEK/ERK/SMAD1 pathway activation in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2019;21(1):11. Published 2019 Jan 23. doi:10.1186/s13058-018-1095-7
  50. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther.* 2021; 221:107753. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753
  51. Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Kułach N. Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3212. Published 2019 Jun 29. doi:10.3390/ijms20133212
  52. Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, et al. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacol Res.* 2020; 153:104683. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104683
  53. Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas).* 2019;56(1):15. Published 2019 Dec 30. doi:10.3390/medicina56010015
  54. Faber, S. (2023). The Tumor Microenvironment. <https://app.biorender.com/profile/smfaber/templates/651dd7632b833ae080a02c2f>
  55. Tiwari A, Trivedi R, Lin SY. Tumor microenvironment: barrier or opportunity towards effective cancer therapy. *J Biomed Sci.* 2022;29(1):83. Published 2022 Oct 17. doi:10.1186/s12929-022-00866-3
  56. Jin MZ, Jin WL. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):166. Published 2020 Aug 25. doi:10.1038/s41392-020-00280-x
  57. Savas P, Salgado R, Denkert C, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(4):228-241. doi:10.1038/nrclinonc.2015.215
  58. Nascimento C, Ferreira F. Tumor microenvironment of human breast cancer, and feline mammary carcinoma as a potential study model. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021;1876(1):188587. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188587
  59. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012:925135. doi:10.1155/2012/925135
  60. Whiteside TL. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Role in Solid Tumor Progression. *Exp Suppl.* 2022; 113:89-106. doi:10.1007/978-3-030-91311-3\_3
  61. Shou J, Zhang Z, Lai Y, Chen Z, Huang J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3<sup>+</sup> Tregs: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2016;16(1):687. Published 2016 Aug 26. doi:10.1186/s12885-016-2732-0
  62. Hammerl D, Martens JWM, Timmermans M, et al. Spatial immunophenotypes predict response to anti-PD1 treatment and capture distinct paths of T cell evasion in triple negative breast



- cancer. *Nat Commun.* 2021;12(1):5668. Published 2021 Sep 27. doi:10.1038/s41467-021-25962-0
63. Hong R, Xu B. Breast cancer: an up-to-date review and future perspectives. *Cancer Commun (Lond)*. 2022;42(10):913-936. doi:10.1002/cac2.12358
  64. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259-271. doi:10.1093/annonc/mdl450
  65. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-499. doi:10.1038/ni.2035
  66. Dolina JS, Van Braeckel-Budimir N, Thomas GD, Salek-Ardakani S. CD8<sup>+</sup> T Cell Exhaustion in Cancer. *Front Immunol.* 2021; 12:715234. Published 2021 Jul 20. doi:10.3389/fimmu.2021.715234
  67. Brunell AE, Lahesmaa R, Autio A, Thotakura AK. Exhausted T cells hijacking the cancer-immunity cycle: Assets and liabilities. *Front Immunol.* 2023; 14:1151632. Published 2023 Apr 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1151632
  68. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol.* 2019; 37:457-495. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055318
  69. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *J Exp Med.* 2015 ;212(9):1345-1360. doi :10.1084/jem.20151159
  70. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun.* 2015 ;6 :6692. Published 2015 Mar 26. doi :10.1038/ncomms7692
  71. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, et al. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity.* 2016 ;45(2) :358-373. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.008
  72. Baumann T, Dunkel A, Schmid C, et al. Regulatory myeloid cells paralyze T cells through cell-cell transfer of the metabolite methylglyoxal. *Nat Immunol.* 2020;21(5):555-566. doi:10.1038/s41590-020-0666-9
  73. MDSCs play metabolic freeze tag with T cells. (s. d.). ACIR (en-US). <https://acir.org/weekly-digests/2020/may/mdscs-play-metabolic-freeze-tag-with-t-cells>
  74. Cell line profile: MDA-MB-231. Culture Collections. <https://www.culturecollections.org.uk/products/cell-cultures/ecacc-cell-line-profiles/mda-mb-231/>
  75. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 1978;14(11):911-915. doi:10.1007/BF02616120
  76. 4T1 - CRL-2539 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-2539>
  77. Jurkat, Clone E6-1 - TIB-152 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/tib-152>

78. Wang T, Douglass EF Jr, Fitzgerald KJ, Spiegel DA. A "turn-on" fluorescent sensor for methylglyoxal. *J Am Chem Soc.* 2013;135(33):12429-12433. doi:10.1021/ja406077j
79. Skordos I, Demeyer A, Beyaert R. Analysis of T cells in mouse lymphoid tissue and blood with flow cytometry. *STAR Protoc.* 2021;2(1):100351. Published 2021 Feb 20. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100351
80. Sartorius. Live-Cell analysis servicing & support. Sartorius. <https://www.sartorius.com/en/products/live-cell-imaging-analysis/live-cell-analysis-servicing-support>
81. Murthy NS. Techniques for analyzing biomaterial surface structure, morphology and topography. In: Elsevier eBooks.; 2011:232-255. doi:10.1533/9780857090768.2.232
82. Nanolive Imaging » Nanolive - A complete solution for your label-free live cell imaging. Nanolive - a Complete Solution for Your Label-free Live Cell Imaging. Published October 11, 2023. <https://www.nanolive.com/technology/live-cell-imaging/nanolive-imaging/>
83. Hoffmann E, Gerwing M, Niland S, et al. Profiling specific cell populations within the inflammatory tumor microenvironment by oscillating-gradient diffusion-weighted MRI. *J Immunother Cancer.* 2023;11(3): e006092. doi:10.1136/jitc-2022-006092
84. Lehuédé C, Dupuy F, Rabinovitch R, Jones RG, Siegel PM. Metabolic Plasticity as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res.* 2016;76(18):5201-5208. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0266
85. Nokin MJ, Durieux F, Bellier J, et al. Hormetic potential of methylglyoxal, a side-product of glycolysis, in switching tumours from growth to death. *Sci Rep.* 2017;7(1):11722. Published 2017 Sep 15. doi:10.1038/s41598-017-12119-7
86. Simões RV, Serganova IS, Kruchevsky N, et al. Metabolic plasticity of metastatic breast cancer cells: adaptation to changes in the microenvironment. *Neoplasia.* 2015;17(8):671-684. doi: 10.1016/j.neo.2015.08.005
87. Sanlorenzo M, Vujic I, Posch C, et al. Melanoma immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(6):665-674. doi:10.4161/cbt.28555
88. Fu Q, Chen N, Ge C, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology.* 2019;8(7):1593806. Published 2019 Apr 3. doi:10.1080/2162402X.2019.1593806
89. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells. *Cell Metab* (2016) 24:657–71. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.011
90. Cohen IJ, Pareja F, Socci ND, et al. Increased tumor glycolysis is associated with decreased immune infiltration across human solid tumors. *Front Immunol.* 2022; 13:880959. Published 2022 Nov 24. doi:10.3389/fimmu.2022.880959

91. Miltenyi Biotec. <https://www.miltenyibiotec.com/BE-en/products/t-cell-activation-expansion-kit-mouse.html>
92. ImmunoCult™ Mouse T Cell Activator Kit | STEMCELL Technologies. <https://www.stemcell.com/products/immunocult-mouse-t-cell-activator-kit.html>
93. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol.* 2017;47(6):946-953. doi:10.1002/eji.201646837
94. Price CL, Hassi HO, English NR, Blakemore AI, Stagg AJ, Knight SC. Methylglyoxal modulates immune responses: relevance to diabetes. *J Cell Mol Med.* 2010;14(6B):1806-1815. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00803.x
95. Zhang Z, Liu S, Zhang B, Qiao L, Zhang Y, Zhang Y. T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:17. Published 2020 Feb 11. doi:10.3389/fcell.2020.00017
96. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.* 2015;6(6): e1792. Published 2015 Jun 18. doi:10.1038/cddis.2015.162
97. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21123-21129. doi:10.1074/jbc.M110675200
98. Chen X, Song M, Zhang B, Zhang Y. Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016:1580967. doi:10.1155/2016/1580967
99. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003;9(10):1269-1274. doi:10.1038/nm934
100. Yu J, Du W, Yan F, et al. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol.* 2013;190(7):3783-3797. doi:10.4049/jimmunol.1201449
101. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):58. Published 2017 Feb 28. doi:10.1186/s13045-017-0430-2
102. Bellier J, Nokin MJ, Caprasse M, et al. Methylglyoxal Scavengers Resensitize KRAS-Mutated Colorectal Tumors to Cetuximab. *Cell Rep.* 2020;30(5):1400-1416.e6. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.012
103. Chiavarina B, Nokin MJ, Bellier J, et al. Methylglyoxal-Mediated Stress Correlates with High Metabolic Activity and Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1):213. Published 2017 Jan 21. doi:10.3390/ijms18010213