

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**  
**lotefa TEITI**

**le** mercredi 29 avril 2015

**Titre :**

Régulation de l'expression de ligands de l'immunité  
par la voie Rho/ROCK sur les mélanomes

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Biotechnologies, Cancérologie

**Unité de recherche :**

UMR 1037 - CRCT - Equipe 3 "RhoGTPases in tumor progression"

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr. Anne-Françoise TILKIN-MARIAME

**Jury :**

Rapporteurs :

Pr. Isabelle BOURGAULT

Pr. Pierre BOBE

Pr. Yannick GUILLOUX

Autres membres du jury :

Pr. Bruno SEGUI

Dr. Anne-Françoise TILKIN-MARIAME



## Résumé

Ma thèse porte sur l'étude des rôles régulateurs des GTPases Rho et de leurs effecteurs ROCK sur l'expression de ligands du système immunitaire, sur des cellules de mélanomes murins et humains ainsi que les conséquences sur le développement tumoral de modulateurs de la voie RhoA/ROCK. A l'heure actuelle, les traitements du mélanome métastatique ont une efficacité limitée, c'est pourquoi les nouvelles stratégies s'orientent vers l'immunothérapie notamment en recherchant de nouvelles molécules pharmacologiques capables d'amplifier les réponses immunes anti mélanome.

Mon travail a porté sur l'étude de trois ligands de l'immunité modulés par la voie RhoA/ROCK:

- Nous avons étudié la régulation du ligand MICA qui est exprimé sur des mélanomes humains, mais qui est reconnu par les cellules NK humaines et murines du système immunitaire inné. En utilisant des statines, qui sont des inhibiteurs de l'activité des Rho, nous avons induit une surexpression membranaire de MICA sans toxicité cellulaire. Cette surexpression s'accompagne d'une sensibilisation des mélanomes à la lyse par les cellules NK. Elle induit également un ralentissement de leur croissance tumorale sous-cutanée en souris NMRI nu/nu et une diminution de l'implantation des métastases pulmonaires. Nous avons aussi montré que cette régulation de MICA induite par les statines ne dépendait pas de l'inhibition des GTPases Ras ou Rho mais de la voie de PPAR $\gamma$ .

- Nous avons ensuite étudié la régulation de la molécule de costimulation CD70 par les GTPases Rho sur des mélanomes humains et son rôle dans ces tumeurs. Nous avons montré que les mélanomes primitifs expriment CD70, que cette expression diminue au cours de la maladie et que la GTPase RhoA et la voie des MAPK contrôlent positivement l'expression de CD70 sur nos lignées de mélanome humain. De façon surprenante, nous avons aussi montré que CD70 possède une fonction non immunologique dans ces tumeurs. En effet, la trimérisation de CD70 favorise l'invasion tumorale et l'apparition de métastases en activant la voie de signalisation BRAF/MEK/ERK/RhoE et en inhibant les fibres de stress d'actine et des points focaux d'adhésion.

- Enfin, nous nous sommes intéressés aux conséquences de la modulation de FasL sur le développement tumoral du mélanome murin B16F10. Des travaux précédents de l'équipe ont montré que la protéine RhoA et ses effecteurs ROCK régulent de façon négative l'expression de FasL à la membrane des cellules B16F10. Nous avons étudié le rôle *in vivo* de la surexpression de FasL induite par l'inhibition de ROCK par le H1152. Nous avons mis en évidence un ralentissement de la croissance tumorale *in vivo* chez les souris immunocompétentes. Ce contrôle du développement tumoral est dépendant de la voie Fas/FasL et de l'activité des lymphocytes TCD8 $^+$  et de l'IFN- $\gamma$ . De plus, l'inhibition de ROCK réduit le nombre de métastases pulmonaires sans intervention de la réponse immunitaire adaptative.

L'ensemble de mes travaux montre que le ciblage de la voie des GTPases Rho et de leurs effecteurs ROCK constitue une approche nouvelle pour amplifier les réponses immunes protectrices innées et adaptatives anti mélanome, suggérant que des inhibiteurs de cette voie pourraient être envisagés dans de nouveaux protocoles d'immunothérapie du mélanome.

## Summary

My thesis focuses on the study of the regulatory roles of Rho GTPases and their effectors ROCK on the expression of immune system ligands in murine and human melanoma cell lines and the impact on tumor development of modulators of the RhoA/ROCK pathway. Current therapies for metastatic melanoma have poor efficiency. It is the reason why new immunotherapeutic strategies are developed for to find new pharmacological molecules that could improve anti-melanoma immune responses.

My work is based on the study of three immune ligands:

- We studied the regulation by Rho GTPases of MICA ligand expression in human melanoma cell lines and their recognition by NK cells. Using statins, inhibitors of Rho GTPases activity, we have induced MICA over-expression without any cell toxicity. This MICA over-expression enhanced melanoma cells sensitivity to NK cells lysis, then reduced subcutaneous tumor growth in NMRI nu/nu mice and also decreased pulmonary metastases implantation. We also showed that statins-induced MICA over-expression was not linked to Ras or Rho GTPases inhibition but to PPAR $\gamma$  pathway.
- Then, we studied the expression and the function of a co-stimulatory molecule, CD70, and its regulation by the Rho pathway in human melanomas. We demonstrated that the RhoA GTPase and MAPK pathway positively regulate CD70 expression in our melanoma cell lines. Surprisingly, we observed a non-immunological function of CD70 in melanoma. Indeed, CD70 trimerization enhanced melanomas invasion and metastatic capacities through an activation of BRAF/MEK/ERK/RhoE pathway, which inhibited stress fibers and focal adhesions.
- Finally, we analyzed the consequences of FasL over-expression on B16F10 murine melanoma development *in vivo*. Our previous studies have showed that RhoA/ROCK pathway negatively regulates membrane FasL expression on B16F10 cells. We studied *in vivo* the role of this FasL over-expression induced by ROCK inhibitor H1152, on melanoma cells. We showed tumor growth shrinkage in immunocompetent mice, when B16F10 cells were pretreated with H1152. The Fas/FasL pathway and the activity of TCD8<sup>+</sup> cells and IFN- $\gamma$  induced this tumor slowing down. Moreover, ROCK inhibition induced a reduction of pulmonary metastases implantation independently of T lymphocytes response.

Altogether, my work showed that targeting Rho GTPases/ROCK pathway could be interesting in order to improve innate and adaptative anti melanoma immune responses, suggesting that inhibitors of this pathway could be envisaged in new melanoma immunotherapy protocols.

# REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs de thèse, le Pr. Isabelle BOURGAULT, le Pr. Yannick GUILLOUX et le Pr. Pierre BOBE. Merci d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail. Et un grand merci au Professeur Bruno SEGUI d'avoir accepté d'être mon président du jury, ainsi que pour l'aide apportée au cours de ma thèse.

Merci au Dr. Nabila JABRANE-FERRAT et au Dr. Bernard MARIAME d'avoir participé à mon comité de thèse et de m'avoir prodiguer vos conseils lors de ce comité.

Je tiens évidemment à remercier le Dr. Anne-Françoise TILKIN-MARIAME ou devrais-je plutôt dire Fafita ! Merci à toi d'avoir été une super chef vraiment très présente, sans qui je n'aurais pas pu effectuer et terminer cette thèse. Merci d'avoir cru en moi et en mes capacités (et Dieu sait qu'il fallait bien quelqu'un pour y croire). Grâce à ta précieuse aide, j'ai appris énormément de choses depuis mon arrivée au laboratoire en tant que « petit stagiaire tahitien qui pense que Tahiti c'est juste de la mer et du sable » (ça reste quand même vrai et ça t'aura marquer n'est-ce pas ?!). Merci pour toutes les manip apprises à tes côtés, je pense notamment avec ce cher FACS Calibur (un bébé bien capricieux en fin de vie !) et avec ton expérience indéniable des petites souris. Une chef comme toi y'en a pas deux, une perle rare j'ai envie de dire ! (oui je sais, j'ai de superbes références). Il va de soi que l'on restera en contact longtemps et malgré les « quelques » kilomètres entre nous, surtout grâce à cette chère technologie qui te tient à cœur (je te vois sourire!). Merci pour tout !

Je tiens à remercier le Pr. Gilles FAVRE de m'avoir accueilli dans votre laboratoire dans lequel j'ai passé d'excellents moments.

Evidemment, je ne peux pas ne pas penser à cette chère Christine PICH (Miss Pich pour les intimes). Merci à toi de m'avoir formé tel un maître Jedi formerait son jeune Padawan. Grâce à toi, j'ai vraiment beaucoup appris autant en terme de manip, que de transmission de savoir d'encadrant à stagiaire (tu es un modèle ne l'oublie pas !). J'ai passé de supers bons moments avec toi dans notre petit bureau du 4<sup>e</sup> étage avec vue sur les toits toulousains. Je pense aussi à nos soirées sushi, à la découverte de ton sponsor officiel de cuisine et à tous nos fous rire ! Je suis vraiment content que ta nouvelle vie à Lausanne te plaise (merci Facebook), comme quoi il n'y a rien de mieux qu'un peu de changement dans sa vie ! C'est à mon tour !

Merci au Dr. Guillaume SARRABAYROUSE (j'ai toujours un doute quand j'écris ton nom de famille). Merci pour toute l'aide que tu m'as apporté pour FasL et l'immunologie ainsi que pour tes encouragements.

Un grand merci à toute la très nombreuse équipe Favre.

Nico le blond et patriote qui est devenu mon voisin de bureau au CRCT, ça été un plaisir de te fournir en biscuits à la fin de ta thèse (il fallait bien ça pour le badge !). Agnese, comment ne pas penser à cette chère italienne avec une imagination débordante et qui m'a donné une renommée (plus ou moins vraie) de chasseur de requin ! Merci à Kenzina de m'avoir appris la différence entre « Bien ou Bieng ? ». Rémi, oh grand spécialiste mode et fashion-victim du labo (tout le monde aura compris l'ironie), je te remercie et te souhaite bon courage pour les révisions, désolé de ne pas pouvoir t'aider ! A Magda (la polonaise provenant de la voie royale) et Marjojo (ma partenaire de séries TV), vos rires si particuliers et si contagieux vont franchement me manquer. A la princesse Faten, n'oublie pas que l'on ne vit pas dans le monde des bisounours, surtout quand quelqu'un prémédite de te faire peur (et adore le faire) ! A Laetitia, j'aurais réussi à trouver une gleeek et à me sentir moins seul ! A Oliver le marathonien du labo, j'espère que NYC c'est pour la prochaine fois... et comme on dit aux States : Yes you can ! A Julia, on aura toujours dix ans de différence, mais plus tard ça n'aura plus d'importance. Une chose est sûre, si j'ai besoin d'un bon pâté du fin fond de la France, je saurais qui appeler ! A Cathy, merci pour ta gentillesse et pour avoir été mon chauffeur plusieurs fois. A Sarah et Aurore, la période d'intégration est terminée, croyez les paroles du doyen des doctorants qui s'en va. Joon ne te fais pas exploiter par Magda ou Agnese sous le prétexte que tu ressembles à un chinois, car tu n'en es pas un ! A Aurélien, n'oublie pas de repasser vers Tahiti pour apprendre d'autres phrases. A Sylvie, on ne se moque pas de ma musculature développée ! Merci à Isa pour ton aide pour les hybridomes. Merci aussi à Laure, Claire, Patrick, Stéphanie, Olivier Anne Pradines, Anne Casa, Magali et Nadia.

La vie à l'ICR a aussi été rythmé par la cohabitation avec l'équipe Moyal (communément appelé les Radiobio) et l'équipe Poirot (l'autre 4<sup>e</sup> étage). Merci à vous pour les moments de culture et votre soutien.

J'ai une pensée pour toi ma Judith, nous qui sommes arrivés à l'ICR en même temps et qui depuis avons fait un long chemin : toi qui a accouché de deux petits garçons et moi d'une thèse, quel travail de dur labeur ! Ma chère Perrine, j'aurais essayé de te voler ton paquet de clopes, mais en vain. Merci pour nos discussions sérieuses ou moins sérieuses. Et j'espère que l'on va se faire cette journée canyoning depuis le temps que j'en entends parler ! Laure, I really enjoyed our little conversations in English and I hope that it will be useful for our future ! Julie, merci de m'avoir fait répéter mes pas de salsa, tu es la meilleure, c'est trop cool de danser avec toi (sans les gens autour) ! Nicolas

Skuli, un drôle personnage que tu es avec tes zizis et tes pingouins. Tous mes voeux pour ta vie aux US avec ta future épouse. Maud, je t'ai déjà dit que je suis fan de tes yeux ?! C'était cool de se parler dans nos bureaux respectifs à l'ICR quand on avait du temps. Aurélie, nos discussions à l'animalerie vont aussi me manquer mais n'aie pas peur de franchir la barrière. Elodie, pour information voici le refrain de la chanson originale : « Melodie d'amour, take this song to my lover », qui ensuite a été remixée à la tahitienne. Marion et Cécile, merci de vous être proposées pour remplacer mes parents pour le jour de soutenance (ça devait être à cause des hormones !). Merci à Emmanuel, Mika et aussi le petit Philou (Teheiura te passe le bonjour).

J'ai aussi une pensée pour les anciens qui sont partis de l'ICR (Audrey, Anne-Laure, Jessica, Loubna, Benoît, Magali, Adrien, Sandra, Emilie) et à tous les stagiaires que j'ai croisé pendant ces cinq ans.

Je n'oublie pas Marie-Ange, Lourdes, Jocelyne, Francine et Jeannine. Merci pour votre sourire, votre sympathie et votre aide qui a été primordiale pour des bonnes conditions de travail.

Je tiens aussi à remercier le service d'enseignement de Biologie Cellulaire de l'UPS notamment Arnaud Labrousse, Laetitia Bricchese, Laurent Baricault et Marjorie Fanjul pour votre aide lors de mes trois années de monitorat avec vous.

A tous mes amis avec qui j'ai traversé la moitié du globe ou que j'ai eu le plaisir de rencontrer en cours de route. Julie, Corinne, Hani, Didier, Claire, Loïc, Muyli, Teioa, Maima, etc.... merci de m'avoir supporté toutes ces années en France moi et mon caractère de « râleur pessimiste » ! (Je m'auto-flagelle, donc profitez-en !)

Enfin un grand merci à toute ma famille qui m'a soutenu et encouragé tout le long du périple de cette thèse. Merci à mes parents, Tiatia et Xavier, Taui et Caro, Keali (le petit prince de la famille), à mes tantes, oncles et cousins et à mon parrain et Aline.

Je termine par dédier cette thèse à ma petite maman d'amour. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ton amour. Merci d'avoir fait le déplacement et de t'être occupé de moi avant le jour J. Ua here vau ia oe !

Merci à tous et à tous ceux que j'ai oublié.

Mauruuru roa





# SOMMAIRE

---

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>TABLEAUX .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>CHAPITRE 1 – LE MELANOME .....</b>	<b>9</b>
I. Généralités.....	9
II. Classification.....	10
III. Traitements actuels.....	12
1. Pronostic.....	12
2. Chirurgie .....	13
3. Chimiothérapie classique.....	13
4. Radiothérapie .....	13
5. Immunothérapie.....	14
6. Les essais cliniques.....	14
A. Les inhibiteurs de la voie BRAF/MEK .....	15
B. Transferts adoptifs de Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs amplifiés et traités in vitro par de l'IL-217	
C. Les stratégies vaccinales avec les cellules dendritiques .....	19
D. Les immunothérapies avec des anticorps anti-CTLA-4 et PD-1 .....	20
<b>CHAPITRE 2 – LES REPONSES IMMUNES .....</b>	<b>24</b>
I. Généralités.....	24
II. Le système immunitaire inné .....	26
III. Le système immunitaire adaptatif .....	30
IV. Les cellules NK .....	31
1. Description.....	31
2. Balance des signaux.....	31
3. Activation des cellules NK.....	32
4. Le récepteur NKG2D et ses ligands .....	33
A. Le récepteur NKG2D : structure, signalisation et fonction .....	33
B. Les ligands de NKG2D .....	34
a. Le ligand RAE-1 .....	35
b. Le ligand MICA.....	35
C. NKG2D et MICA dans la thérapie anti tumorale .....	36
V. Les lymphocytes T (LT).....	37
1. Les LT CD4+ .....	37
2. Les LT CD8+ .....	41
3. L'immunoscore : un facteur de bon pronostic du cancer colorectal .....	43
VI. Les molécules de costimulation .....	46
1. La costimulation par le récepteur CD28 et ses ligands activateurs CD80/CD86.....	46
2. La costimulation par le récepteur CD27 et son ligand CD70 .....	47
VII. Les molécules de corépression .....	49
1. La corépression par le récepteur CTLA-4 et ses ligands CD80/CD86 : .....	50
2. La corépression par le récepteur PD-1 et son ligand PD-L1 : .....	51
VIII. Le troisième signal d'activation .....	51
IX. Immunoédition.....	52
1. L'élimination .....	53

2.	L'équilibre .....	53
3.	L'échappement .....	53
A.	Les modifications intrinsèques de la tumeur .....	54
a.	Modification de la reconnaissance antigénique .....	54
b.	Résistance à l'apoptose .....	55
c.	Absence de costimulation ou costimulation inhibitrice .....	55
d.	L'induction de l'apoptose des effecteurs immuns par la voie Fas/FasL .....	56
i.	Description.....	56
ii.	Expression.....	57
iii.	Signalisation .....	57
iv.	Fonctions physiologiques .....	59
v.	Les rôles non-apoptotiques de Fas et FasL .....	61
vi.	Arguments en faveur d'un rôle pro-tumoral de FasL .....	61
vii.	Arguments en faveur d'un rôle anti tumoral de FasL.....	63
e.	L'induction de l'apoptose des effecteurs immuns par la voie TRAIL.....	63
B.	Les modifications extrinsèques de la tumeur .....	64
<b>CHAPITRE 3 – Les GTPases Rho.....</b>		<b>66</b>
I.	Généralités.....	66
II.	Structure.....	67
III.	Régulation .....	68
IV.	Cycle GDP/GTP .....	68
V.	La GTPase RhoA .....	69
VI.	ROCK.....	69
1.	Structure .....	69
2.	Fonctions .....	71
VII.	La voie RhoA/ROCK dans les réponses immunes.....	73
VIII.	Les GTPases Rho dans l'oncogénèse.....	74
IX.	Les kinases ROCK dans l'oncogénèse .....	75
X.	Utilisation clinique des inhibiteurs de Rho dans le traitement de cancers.....	76
XI.	Thérapies basées sur les inhibiteurs des ROCK .....	77
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>		<b>79</b>
<b>RESULTATS .....</b>		<b>81</b>
<b>Résultats I.....</b>		<b>81</b>
<b>Résultats II.....</b>		<b>83</b>
<b>Résultats III.....</b>		<b>85</b>
<b>Résultats IV.....</b>		<b>87</b>
<b>Résultats V.....</b>		<b>89</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>		<b>91</b>
<b>1) Le ciblage de la voie des GTPases Rho par les statines favorise une réponse immune innée anti mélanome. ....</b>		<b>91</b>
<b>2) CD70 : un marqueur des capacités métastatiques du mélanome régulé par les GTPases Rho</b>		<b>95</b>
<b>3) Régulation de FasL par les ROCK et contrôle des réponses immunes anti mélanome.....</b>		<b>99</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>104</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1 : Les différentes phases de la progression du mélanome (Gray-Schopfer et al, 2007).....	10
Figure 2 : Classification des mélanomes par l'indice de Clark.....	12
Figure 3 : Les traitements ciblés de la voie BRAF/MAPK dans le mélanome (adapté de (Jang & Atkins, 2014)).....	15
Figure 4 : Les sites de mutation ou de surexpression impliqués dans les mécanismes de résistance aux traitements ciblés de la voie BRAF/MAPK dans le mélanome (adapté de (Hertzman Johansson & Egyhazi Brage, 2014; Spagnolo et al, 2015) ).....	17
Figure 5 : Transfert adoptif de TIL autologues (adapté de (Rosenberg et al, 2008).....	18
Figure 6 : Protocoles de vaccination par les cellules dendritiques (CD) (adapté de (Tacken et al, 2007) ).....	19
Figure 7 : Ciblage de la voie CTLA-4 par l'anticorps thérapeutique Ipilimumab (adapté de Lebbé et al., EMSO, 2008).....	21
Figure 8 : Ciblage de la voie PD-1 par l'anticorps monoclonal Nivolumab (Mamalis et al, 2014) .....	22
Figure 9 : Le microenvironnement tumoral (Junttila & de Sauvage, 2013) .....	24
Figure 10 : Modèle synthétique de l'immunosurveillance et de l'immunoediting (Prendergast, 2013).....	25
Figure 11 : Cellules participant au système immunitaire inné et adaptatif (Dranoff, 2004).....	26
Figure 12 : Macrophages M1 et M2 (adapté de (Schmid & Varner, 2010)).....	27
Figure 13 : Les cellules dendritiques à l'interface entre le système immunitaire inné et adaptatif (Munz et al, 2005).....	30
Figure 14 : La balance d'intégration des signaux activateurs et inhibiteurs des cellules Natural Killer (Vivier et al, 2012) .....	32
Figure 15 : La signalisation couplée entre l'activation par le récepteur NKG2D et le récepteur à l'IL-15 (Zafirova et al, 2011).....	34
Figure 16 : Le récepteur NKG2D et ses ligands chez l'homme et la souris (Eagle & Trowsdale, 2007).....	35
Figure 17 : Activation d'un lymphocyte T (adapté de (Alegre et al, 2001)).....	38
Figure 18 : Polarisation des lymphocytes T CD4+ (adapté de (Geginat et al, 2013)).....	39
Figure 19 : L'attraction et l'amplification des Treg par les cellules de mélanome (Jacobs et al, 2012).....	40
Figure 20 : Cytotoxicité lymphocytaire médiée par la voie Fas/FasL ou la voie perforine/granzymeB (Barry & Bleackley, 2002) .....	41
Figure 21 : Corrélation entre la densité de lymphocytes T CD8+CD45RO+ (LT mémoires) et la survie des patients dans le cancer colorectal (adapté de (Pages et al, 2005)) .....	42
Figure 22 : Corrélatin de la survie de patients atteints de mélanomes à la densité de cellules immunes infiltrants les tumeurs (adapté d' (Erdag et al, 2012)).....	43
Figure 23 : L'infiltrat de TIL a une valeur pronostique supérieure à celle fournie par la classification TNM dans le cancer colorectal (Galon et al, 2006).....	44
Figure 24 : La densité et la localisation des différents types de populations cellulaires au cours de l'évolution du cancer colorectal (adapté de (Bindea et al, 2013)).....	45
Figure 25 : Validation internationale de l'immunoscore (adapté de (Galon et al, 2012a)) Centres d'étude sur le cancer participant à la validation internationale de l'immunoscore. (B) Procédures standards pour la mise en évidence de l'immunoscore. ....	45
Figure 26 : Les couples ligand/récepteur de la superfamille des Ig et leurs fonctions costimulatrices ou coinhibitrices sur l'activité des LT (adapté de (Pardoll, 2012) .....	46
Figure 27 : les couples ligand/récepteur de costimulation de la superfamille des TNFR/TNF (d'après (Watts, 2005)).....	47
Figure 28 : Les cascades de signalisation induites par la liaison entre CD27 et CD70 (d'après (Diegmann et al, 2006; Garcia et al, 2004; Prasad et al, 1997; Yamamoto et al, 1998)).....	48
Figure 29 : L'inhibition de la réponse immune par CTLA-4 (d'après (Rudd, 2008)) .....	50

Figure 30 : L'inhibition de l'activation des LT par PD-1/PD-L1, via l'inhibition de la PI3K (Keir et al, 2008).....	51
Figure 31 : L'immunoédition des cellules tumorales (Schreiber et al, 2011).....	52
Figure 32 : L'ensemble des mécanismes d'échappement tumoral et des effecteurs immuns impliqués (Vesely et al, 2011).....	54
Figure 33 : Mécanismes d'échappement intrinsèques dépendant du contact cellulaire (adapté de (Stewart & Abrams, 2008)).....	55
Figure 34 : Structure de Fas et FasL .....	57
Figure 35 : Les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose (adapté de (Pope, 2002)).....	59
Figure 36 : Fonctions physiologiques de la voie Fas/FasL .....	60
Figure 37 : La contre-attaque tumorale par FasL (Bohana-Kashtan & Civin, 2005).....	62
Figure 38 : Signalisations apoptotique et non-apoptotique de TRAIL et ses différents récepteurs (Wu & Lippman, 2011) .....	64
Figure 39 : Arbre phylogénétique des GTPases de la superfamille Rho (Vega & Ridley, 2008).....	66
Figure 40 : Structure des GTPases Rho (Hodis et al, 2012) .....	67
Figure 41 : Le cycle d'activation des GTPases Rho (Huveneers & Danen, 2009) .....	69
Figure 42 : Structure moléculaire des kinases ROCK-I et ROCK-II (adapté de (Mueller et al, 2005))	70
Figure 43 : Mécanismes de régulation de l'activité des ROCK (Mueller et al, 2005).....	71
Figure 44 : Les kinases ROCK régulent le cytosquelette d'actine par deux mécanismes principaux (Rath & Olson, 2011) .....	72
Figure 45 : Processus tumoraux majeurs régulés par les GTPases Rho (Karlsson et al, 2009).....	74
Figure 46 : Voie du mévalonate simplifiée et inhibiteurs .....	77

## TABLEAUX

---

Tableau 1 : Les antigènes de tumeurs .....	11
Tableau 2 : Classification des mélanomes par l'indice de Breslow.....	12
Tableau 3 : Altération des GTPases Rho dans les cancers (adapté de (Alan & Lundquist, 2013; Karlsson et al, 2009)) .....	75

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

Ac	Anticorps
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ag	Antigène
AICD	Activated Induced Cell Death
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ALM	Acral Lentiginous Melanoma
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrom
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APC	Antigen-Presentative Cell (cellule présentatrice d'antigène)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
Bak	BCL2-antagonist/killer
Bax	BCL2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2 protein
BID	BH3 interacting-domain death agonist
c-FLIP	FLICE inhibitory protein
CD	Cellule Dendritique
CMH-I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CRD	Cystein-Rich Domain
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte (Lymphocyte T cytotoxique)
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAP10	DNAX-activating protein 10kDa
DAP10 ou 12	DNAX-activation protein 10 ou 12
DcR	Decoy Receptor (récepteur leurre)
DED	Death Effector Domain
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DNAM-1	DNAX Accessory Molecule-1
Endo G	Endonucléases G
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
FADD	Fas-Associated Death Domain
FasL	Fas Ligand
Fc	Fragment constant des immunoglobulines
FDA	Food and Drug Association
FTI	Farnesyl Transferase Inhibitor
GAP	GTPase Activating Protein
GDI	GDP Dissociation Inhibitor

GDP	Guanine DiPhosphate
GEF	Guanine Exchange Factor
GGTI	Geranygeranyl Transferase Inhibitor
<i>gld</i>	Generalized Lymphoproliferative Disease
GM CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
gp100	glycoprotéine 100
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanine TriPhosphate
HDAC	Histone Désacétylase
HMG-coA	3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
IAP	Inhibitors of Apoptosis
IDO	Indoléamine 2,3-DiOxygénase
IFN- $\alpha$ ou $\gamma$	Interféron-alpha ou gamma
Ig	Immuglobuline
IL-	Interleukine-
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KIR	Killer cell Immunoglobulin-like Receptor
KO	Knock-Out
LIMK1, 2	LIM domain kinase 1, 2
LMM	Lentigo Malignant Melanoma
<i>lpr</i>	Lymphoproliferation
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MART-1	Melanoma Antigen Recognized by T cells 1
mDial	Mammalian homolog of Drosophila Diaphanous 1
MDSC	Myeloid-Derived Suppressive Cells (cellules myéloïdes suppressives)
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MEK	MAPK/ERK Kinase
MICA ou MICB	MHC class I Chain-related proteins A ou B
MLC	Myoin Light Chain
MLCK	MLC Kinase
MLCP	MLC Phosphatase
MMP	Métalloprotéase
MULT-1	Murine ULBP-like Transcript 1
MYPT-1	Myosin Phosphatase Target subunit 1
NCR	Natural Cytotoxic Receptors
NF-kB	Nuclear Factor kappa B
NIK	NF- $\alpha$ B Inducing Kinase
NK	Cellule Natural Killer
NKG2A ou D	NK Group 2 member A ou D
NKT	Lymphocyte NKT
NM	Nodular Melanoma

PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PD-1	Programmed Death 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PH domain	Pleckstrin homology domain
PI3K	PhosphoInositide 3 Kinase
PLAD	Pre-Ligand binding Assembly Domain
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RAE 1	Retinoic acid early inducible-1
RAG2	Recombination activating gene 2
RAS	Rat Sarcoma virus
RBD	Rho-Binding Domain
RGP	Radial Growth Phase
ROCK	RhO-associated, Coiled-coil Containing Protein Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SI	Système Immunitaire
SSM	Superficial Spreading Melanoma
Syk	Spleen tyrosine kinase
TAA	Tumor-Associated Antigen (Antigène associé aux tumeurs)
TAM	Tumor Associated Macrophages (macrophages associés aux tumeurs)
TAP1 ou 2	Transporter associated with Antigen Processing 1 ou 2
TCR	T Cell Receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
Th	Lymphocyte T helper (auxiliire)
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocytes (Lymphocytes infiltrant les tumeurs)
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor NecrosIs Factor
TNM	Classification Tumor-Node-Metastase
TRAF2 ou 5	TNF receptor-associated factor 2 ou 5
TRAIL	TNF-Related Apoptosis- Inducing Ligand
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRP-2	Tyrosinase-related protein 2
ULBP 1-4	Unique-Long 16 Binding Protein 1 a` 4
UV	Rayons Ultra-Violets
Vav1	Vav 1 guanine nucleotide exchange factor
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
VEGFR	VEGF Receptor
VGP	Vertical Growth phase
ZAP70	Zeta-chain (TCR) Associated Protein kinase 70kDa





# INTRODUCTION

---

## CHAPITRE 1 – LE MELANOME

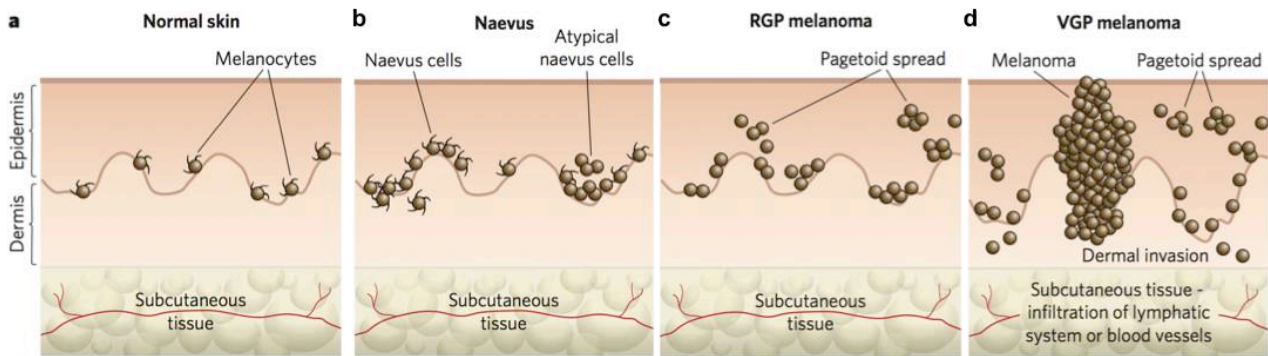
### I. Généralités

Le mélanome est une tumeur cutanée maligne relativement rare (moins de 5% de l'ensemble des cancers de la peau) mais particulièrement agressive car elle est à l'origine de la majorité des décès liés aux cancers cutanés (Chen et al, 2013; Rogers et al, 2010). Actuellement, son incidence est en forte augmentation : alors qu'elle doublait tous les 15 ans depuis 1950, elle a triplé ces 20 dernières années (Belot et al, 2008). Il est, de plus, devenu la première cause de mortalité par cancer chez les jeunes adultes (Institut Curie).

Ce cancer concerne tous les âges. Le soleil constitue le premier facteur environnemental impliqué dans l'épidémiologie de cette forme de cancer. Toutefois, d'autres facteurs de risque ont été établis : le phototype, les facteurs génétiques (10% des mélanomes) liés aux mutations des gènes *cdkn2* et *cdk4* ainsi que l'existence d'antécédents personnels et familiaux de mélanome, l'immunodépression et enfin le nombre de nævi (20-30% des cas) (de Snoo & Hayward, 2005; Gandini et al, 2005).

Le mélanome cutané se développe à partir de mélanocytes, les cellules productrices de la mélanine. La mélanine est le pigment cutané protecteur contre les rayonnements Ultra-Violets (UV) du soleil. Les mélanocytes sont localisés dans la couche la plus interne de l'épiderme : la couche basale. Les mélanomes peuvent apparaître à partir de mélanocytes isolés ou de nævi. Les nævi, considérés comme des tumeurs bénignes, sont constitués d'un amas de mélanocytes.

La première étape dans le développement d'un mélanome est la transformation des mélanocytes par acquisition de mutations provoquant une prolifération anarchique et incontrôlée. La première phase de croissance du mélanome est dite radiale (RGP) car le mélanome s'étend de manière latérale au sein même de l'épiderme. La deuxième phase de croissance est dite verticale (VGP) car le mélanome devient plus agressif et s'étend verticalement en envahissant les tissus sous-jacents. Il atteint pour finir les vaisseaux sanguins et lymphatiques ce qui lui permet de métastaser jusqu'aux organes receveurs tels que les ganglions lymphatiques, les viscères et le cerveau (Gray-Schopfer et al, 2007) (Figure 1).



**Figure 1 : Les différentes phases de la progression du mélanome (Gray-Schopfer et al, 2007)**

**a) Peau saine :** Mélanocytes localisés sur la couche basale de l'épiderme. **b) Nævus mélanocytaire bénin :** Augmentation du nombre de mélanocytes regroupés en amas. **c) Mélanome à croissance horizontale (RGP melanoma) :** prolifération radiale des cellules de mélanome. **d) Mélanome à croissance verticale (VGP melanoma) :** prolifération verticale, derme envahi, infiltration potentielle du système vasculaire et lymphatique pour atteindre le stade de mélanome malin métastatique.

## II. Classification

Les mélanomes cutanés sont classés en quatre types (Choi et al, 2011) :

- Le mélanome de Dubreuilh (Lentigo Malignant Melanoma, LMM). Cette tumeur (10% à 15% des mélanomes) apparaît en général chez les personnes âgées à partir d'une mélanose au niveau de la tête. La phase de développement intra-dermique de ce mélanome est longue. Mais dès lors qu'il évolue vers une forme invasive, son pronostic devient comparable aux autres types de mélanome.
- Le mélanome nodulaire (Nodular Melanoma, NM). Le NM (10% à 15% des mélanomes) est une tumeur agressive, proliférant d'emblée verticalement pour envahir le derme et les ganglions lymphatiques.
- Le mélanome lentigineux des extrémités (Acral Lentiginous Melanoma, ALM). Cette tumeur (5% des mélanomes) se développe sur la plante des pieds et plus rarement sur la paume des mains. Elle présente un potentiel d'agressivité et d'infiltration des structures sous-jacentes assez important.
- Le mélanome à extension superficielle (Superficial Spreading Melanoma, SSM). Il s'agit de la forme la plus fréquente de mélanomes (70% des mélanomes). Il est associé à des épisodes répétés de brûlures solaires le plus souvent survenues dès le jeune âge. Il présente dans un premier temps une lente extension horizontale et superficielle, puis une extension verticale avec une infiltration vers le derme. Ce mélanome regroupe plusieurs critères dits « ABCDE » : A pour Asymétrie générale des contours et du pigment, B pour Bords irréguliers, C pour Couleurs multiples, D pour Diamètre supérieur à 6 mm, E pour Érythème persistant périphérique ou pour Evolution (Abbasi et al, 2004).

Le mélanome fait partie des tumeurs qui ont un fort potentiel immunogène. Les cellules tumorales de mélanome expriment à leur surface des Antigènes Associés aux Tumeurs (Tumor Associated Antigen, TAA) capables d'induire des réponses immunes anti mélanome. Diverses études ont permis de les identifier et les décrire (Tableau 1).

**Tableau 1 : Les antigènes de tumeurs (adapté de(Vigneron et al, 2013))**

<b>Antigènes tumoraux</b>	<b>Cancers</b>
<b>Antigène de différenciation</b> Melan-A/MART-1 gp100 TRP-1, -2	Mélanome Mélanome Mélanome
<b>Antigènes communs spécifiques de tumeurs</b> MAGE BAGE GAGE NY-ESO-1	Mélanome Mélanome Tumeurs variées
<b>Antigènes issus de mutations ponctuelles</b> RasV12 CDK4 p53	Pancréas Mélanome Tumeurs variées
<b>Antigènes surexprimés</b> HER-2/neu Télomérase P53	Sein, ovaires, poumons Tumeurs variées Tumeurs variées
<b>Antigènes viraux</b> E6-E7 papillomavirus  LMP1-LMP2 EBV	Col de l'utérus Lymphomes, nasopharynx

Les antigènes de différenciation, les antigènes communs spécifiques de tumeurs et les antigènes issus de mutations ponctuelles ont été identifiés dans le mélanome, par contre les antigènes surexprimés et les antigènes viraux ne sont pas retrouvés dans les mélanomes. Ainsi, des antigènes provenant de la différenciation des mélanocytes, tels que MelanA-MART1 (Van den Eynde & Boon, 1997), gp100 et la tyrosinase TRP-2 (Renkvist et al, 2001) sont très fréquemment retrouvés. Ces antigènes sont faiblement exprimés sur les mélanocytes sains et fortement exprimés sur les cellules de mélanome. Cette catégorie d'antigènes est la plus souvent ciblée pour les thérapies par transfert adoptif et par vaccination. Ensuite, les TAA cancer/testis proviennent du lignage des cellules germinales et sont anormalement exprimés sur les cellules somatiques cancéreuses. Parmi les antigènes communs spécifiques des tumeurs, les TAA MAGE (MAGE 1, 2 et 3) et NY-ESO- 1 ont notamment été décrits dans les mélanomes et ils ont été bien étudiés pour leurs capacités immunogènes (Juretic et al, 2003). Les TAA liés aux mutations ponctuelles de gènes apparaissant individuellement chez les patients ont également été retrouvés dans différents types de cancer dont les mélanomes (Linard et al, 2002; Sharkey et al, 2004; Wolfel et al, 1995). Les deux derniers groupes correspondent à des antigènes surexprimés qui sont liés à des mutations communes dans différentes tumeurs ou à des infections virales mais qui ne sont pas retrouvés dans les mélanomes.

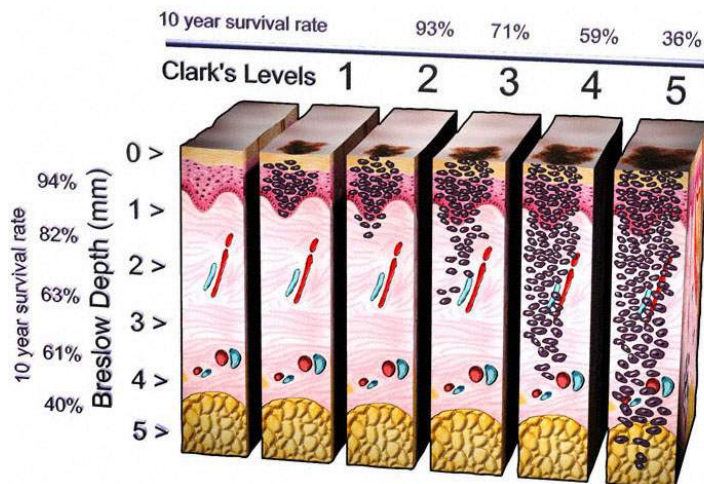
### III. Traitements actuels

#### 1. Pronostic

Actuellement, le pronostic de survie générale à 5 ans d'un patient porteur de mélanome et ayant subi une exérèse chirurgicale se fait grâce à l'indice de Breslow en corrélant épaisseur du mélanome et pronostic (Breslow, 1970) (Tableau 2). Il mesure l'épaisseur entre la couche granuleuse de l'épiderme et la cellule la plus profonde du mélanome. A ce jour, cet indice reste le critère pronostic principal du mélanome primaire (Owen et al, 2001). Il participe à la détermination du stade et permet pour la chirurgie de déterminer la taille des marges d'exérèse complémentaires. Il n'est toutefois pas assez précis et nécessite des ajustements qui peuvent faire varier le pronostic de survie, notamment si les ganglions drainants sont métastasés et si le mélanome est ulcéré. Un autre indice développé par Wallace Clark (Clark et al, 1969) distingue 5 stades de mélanome basés sur le niveau d'invasion des cellules tumorales dans les tissus sous-jacents (Figure 2).

**Tableau 2 : Classification des mélanomes par l'indice de Breslow.**

Indice de Breslow (IB) (épaisseur)	Estimation de la survie générale à 5 ans
IB < 0,75 mm	96%
IB < 1,5 mm	87%
1,5 mm ≤ IB < 2,5 mm	75%
2,5 mm ≤ IB < 4 mm	66%
IB > 4 mm	44%



**Figure 2 : Classification des mélanomes par l'indice de Clark**

Des études récentes montrent l'intérêt pour le pronostic de prendre en compte le microenvironnement immun tumoral et en particulier la présence et la localisation de lymphocytes en périphérie ou au sein des tumeurs. Ces évaluations sont statistiquement plus pertinentes que l'indice de Breslow classique pour évaluer la survie générale à 5 ans (Erdag et al, 2012; Galon et al, 2006). Nous reviendrons plus en détail sur cet aspect dans le chapitre 2 – Partie V-2 (page 42).

## **2. Chirurgie**

L'exérèse complète de la tumeur primaire est le traitement de première ligne du mélanome. L'exérèse permet de confirmer le diagnostic effectué. De plus, selon le diagnostic effectué suite à la biopsie, un élargissement de l'exérèse des tissus sains entourant la tumeur est nécessaire pour réduire les risques de récurrence (Bichakjian et al, 2011). La marge entoure la zone tumorale, de 0,5 cm (pour un mélanome *in situ*) jusqu'à 2 à 3 cm (pour un mélanome de plus de 4 mm), et elle est de 1 cm pour un mélanome de Dubreuilh (InCA, 2010). Dans 80% des cas, la chirurgie est curative sans récurrences ni métastases ultérieures. Pour les mélanomes qui sont déjà au stade métastatique, la survie du patient diminue de façon importante (15% à 2 ans et 5% à plus de 5 ans) (Mouawad et al, 2010; Thompson et al, 2005)..

## **3. Chimiothérapie classique**

La chimiothérapie est proposée pour les mélanomes métastatiques lors d'envahissements des ganglions ou d'organes à distance. Deux drogues sont majoritairement utilisées : la Dacarbazine et la Fotémustine.

La Dacarbazine est le précurseur du Diazométhane, un agent alkylant qui perturbe les divisions cellulaires et qui conduit à une mort rapide des cellules en division. Aux USA depuis 1975, la Dacarbazine a une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et elle est le traitement de première ligne en monothérapie du mélanome avancé en l'absence de métastases cérébrales. En Europe, la Dacarbazine est prescrite pour les mélanomes métastatiques. Néanmoins, cette thérapie n'est que faiblement efficace (Mouawad et al, 2010) car les taux de réponses globales sont de 7,2% avec moins de 5% de réponses complètes. De plus, ces réponses sont généralement de courtes durées (3 à 6 mois) et la survie globale est de 5,6 mois.

La Fotémustine est utilisée lors de métastases cérébrales. Cette molécule appartient à la famille des nitrosourées, agents alkylants qui passent la barrière céphalo-rachidienne. Le taux de réponse globale est de 15,5% avec une survie globale de 7,3 mois (Mouawad et al, 2010). Néanmoins, la Fotémustine possède des effets secondaires plus importants que la Dacarbazine (Avril et al, 2004).

## **4. Radiothérapie**

La radiothérapie est globalement peu utilisée dans la thérapie du mélanome. Le principal objectif est d'ordre palliatif afin de soulager les souffrances lors de métastases osseuses douloureuses ou cérébrales non opérables (HAS, 2012) et d'améliorer la qualité de vie du patient (InCA, 2010). Néanmoins, l'utilité de la radiothérapie dans le mélanome peut être reconsidérée en combinaison avec une immunothérapie se basant sur un transfert adoptif de lymphocytes. En effet, les travaux de Dudley et Rosenberg ont montré qu'une meilleure lymphodéplétion préalable des patients, réalisée par irradiation des patients améliorerait l'efficacité des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL)

autologues injectés aux patients atteints d'un mélanome avec de l'InterLeukine-2 (IL-2) (Dudley et al, 2008; Rosenberg et al, 2008).

## **5. Immunothérapie**

La prédisposition à l'apparition de cancers dans des souris ou des patients en situation d'immunodéficience a révélé l'implication des réponses immunitaires dans le développement de cancers (Silverberg et al, 2011; Zwald et al, 2010).

Parmi tous les cancers, le mélanome est l'une des tumeurs les plus immunogènes où le rôle protecteur de l'immunité semble considérable. Plusieurs études ont révélé un nombre non négligeable de régressions spontanées chez les patients porteurs de mélanome et ceci à différents stades de la maladie (Bramhall et al, 2014; Kalialis et al, 2009). De plus, la présence d'un infiltrat de lymphocytes T (LT) est un marqueur de bon pronostic attestant qu'un recrutement intra tumoral des effecteurs de l'immunité favorise l'élimination de la maladie (Erdag et al, 2012; Nikolaou et al, 2012). De nombreuses études portant sur ces réponses immunitaires anti mélanome ont mis en lumière des interactions complexes entre diverses cellules immunitaires : les macrophages, les cellules NK, les cellules dendritiques et les lymphocytes T cytotoxiques, auxiliaires ou régulateurs. Nous reviendrons plus en détail sur ces populations immunes dans le chapitre 2 (page 26).

A cause de leur immunogénicité, les mélanomes sont devenus des modèles privilégiés pour l'étude des interactions entre système immunitaire et tumeurs et pour l'évaluation de stratégies d'immunothérapie. Ces stratégies visent à stimuler les réponses immunes du patient afin que ce dernier élimine ou contrôle plus efficacement sa propre tumeur.

L'immunothérapie avec de l'Interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) par administration systémique est proposée aux patients en complément de la chirurgie lorsque le mélanome est ulcéré et qu'il dépasse 1,5 mm d'épaisseur, ou en cas d'envahissement du ganglion sentinelle (InCA, 2010).

L'IFN- $\alpha$  a des effets anti-prolifératifs, anti-angiogéniques et immunomodulateurs. Il induit une plus forte infiltration des tumeurs par des Lymphocytes T CD4+ et l'augmentation de l'expression membranaire tumorale des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I (CMH-I). Malgré toutes ces propriétés, les effets cliniques de l'IFN- $\alpha$  sont très décevants car les réponses cliniques observées ne sont que de l'ordre de 15% avec moins de 5% de réponses complètes. L'IFN- $\alpha$  semble être plus efficace chez des patients qui n'ont pas eu d'atteintes viscérales (Topalian et al, 2011). Globalement, l'efficacité de ces traitements est limitée puisqu'ils permettent une augmentation de la survie sans progression mais pas de la survie globale (Thompson et al, 2005).

## **6. Les essais cliniques**

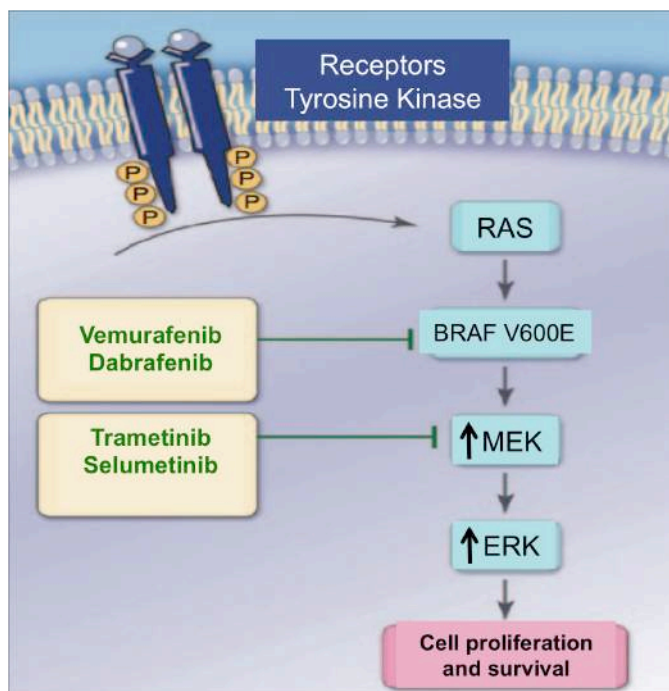
L'efficacité globale faible des traitements classiques par chimiothérapie, immunothérapie et radiothérapie a favorisé l'émergence de nouveaux axes thérapeutiques pour le traitement du mélanome métastatique.

Les principaux essais cliniques pour tenter d'améliorer la survie des patients reposent sur : les chimiothérapies avec des inhibiteurs de la protéine BRAF mutée en position V600E (BRAF V600E) ; les immunothérapies par transferts adoptifs de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) autologues et traités *in vitro* avec de l'InterLeukine-2 (IL-2), ou des stratégies vaccinales (vaccination thérapeutique) et les anticorps monoclonaux thérapeutiques.

#### A. Les inhibiteurs de la voie BRAF/MEK

De nos jours, le développement de chimiothérapies ciblées est en pleine expansion car il est porteur d'espoir.

La mutation activatrice de la kinase BRAF en position 600 (BRAF V600E) est présente dans plus de 50% des mélanomes cutanés, ce qui en fait une cible privilégiée (Gray-Schopfer et al, 2007). Cette mutation active constitutivement la voie BRAF/MEK/ERK (Fecher et al, 2008; Jang & Atkins, 2014) (Figure 3) et favorise la prolifération et la survie des cellules tumorales (Wellbrock & Hurlstone, 2010; Wellbrock et al, 2008).



**Figure 3 : Les traitements ciblés de la voie BRAF/MAPK dans le mélanome (adapté de (Jang & Atkins, 2014))**

Le premier inhibiteur utilisé a été le Sorafenib (Nexavar®, Bayer Schering Pharma Ag). C'est un inhibiteur à large spectre de l'activité de tyrosines kinases telles que VEGFR, PDGFR et RAF, mais il a été progressivement abandonné car il induit de nombreux effets indésirables (apparition de nævi, troubles du développement kératinocytaire) (Bennani-Lahlou et al, 2008; Jantzem et al, 2009). De ce fait, le ciblage plus spécifique des protéines BRAF et MEK est apparu plus judicieux.

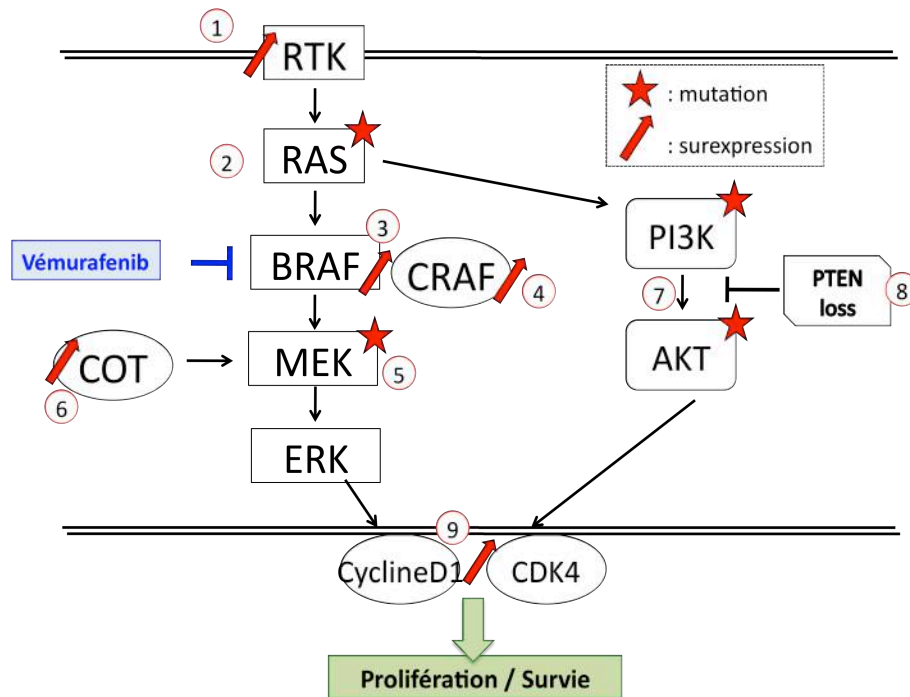
Plusieurs inhibiteurs spécifiques de BRAF V600E tels que le PLX-4720 (Plexxikon) et son dérivé le PLX-4032 (Zelboraf®, Vemurafenib, Roche Pharmaceuticals) ont été testés en phase clinique (Chapman et al, 2011; Flaherty et al, 2010; Tsai et al, 2008). Ces inhibiteurs bloquent avec une grande efficacité l'activité de la protéine BRAF V600E et inhibent ainsi la voie de signalisation en aval (MEK/ERK). Ils semblent prometteurs pour stabiliser la maladie mais pas assez efficaces pour l'éradiquer. Les essais cliniques de phase III du PLX-4032 ont montré son efficacité chez l'Homme car 48% des patients développent une réponse objective contre 5% pour le groupe traité à la Dacarbazine. La médiane de survie sans progression est de 5,7 mois pour le PLX-4032 contre 1,6 mois pour la Dacarbazine (Chapman et al, 2011). Ces résultats ont conduit à l'obtention d'une AMM par la Food and Drug Administration (FDA) en août 2011, d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) en France à la même date puis d'une AMM européenne en février 2012. Il est important de noter que l'utilisation de ces deux inhibiteurs de BRAF est restreinte aux tumeurs exprimant la protéine BRAF V600E car des effets délétères ont été rapportés lors de leur utilisation sur des tumeurs exprimant la protéine sauvage (Poulikakos et al, 2011).

Par ailleurs de façon inattendue et intéressante, des études récentes ont démontré que le Vémurafenib avait également des propriétés favorisant les réponses immunes anti mélanome. En effet, il semble conduire à la réexpression d'antigènes de mélanome, induire un infiltrat de lymphocytes T CD8+ et favoriser la cytotoxicité de ces lymphocytes (Frederick et al, 2013; Sapkota et al, 2013). D'autres études ont mis en évidence que le Vémurafénib induit l'émergence d'une population clonale de lymphocytes T déjà présente dans des biopsies de patients (Cooper et al, 2013).

Un autre inhibiteur de BRAF V600E, le Dabrafenib développé par les laboratoires GSK, a également reçu une AMM en mai 2013.

Malheureusement, les études cliniques ont mis en évidence des patients résistants d'emblée (résistance primaire) mais surtout une majorité de patients répondeurs au PLX-4032 qui devenaient à terme résistants (résistance secondaire). Ces résistances proviennent généralement d'une réactivation ou du maintien de l'activation de la voie MAPK sous Vemurafenib. De nombreuses études tentent d'élucider ces résistances primaires et secondaires (Kugel & Aplin, 2014; Lidsky et al, 2014; Sun et al, 2014a). Ces études sont schématisées dans la figure 4, qui présente les sites de mutations ou de surexpression qui ont été décrits comme impliqués dans ces résistances.





**Figure 4 : Les sites de mutation ou de surexpression impliqués dans les mécanismes de résistance aux traitements ciblés de la voie BRAF/MAPK dans le mélanome (adapté de (Hertzman Johansson & Egyhazi Brage, 2014; Spagnolo et al, 2015))**

Enfin, d'autres inhibiteurs de la voie des MAPK et en particulier de MEK (une kinase en aval de BRAF) sont également utilisés dans le traitement du mélanome métastatique (Figure 3). Le Trametinib a obtenu une AMM suite à un essai de phase III montrant une amélioration significative de la survie sans progression (4,8 *versus* 1,5 mois) et de la survie globale à 6 mois (81% *versus* 67%) en comparaison avec un traitement à la Dacarbazine (Flaherty et al, 2012b). Le Trametinib associé au Dabrafenib améliore la survie sans progression (9,4 *versus* 5,8 mois) et le taux de réponses objectives (76% *versus* 54%) par rapport au Dabrafenib seul (Flaherty et al, 2012a). Le Selumetinib seul n'a montré aucun effet clinique bénéfique (Kirkwood et al, 2011) et associé à la Dacarbazine, il n'y a là encore que des effets modestes sur la survie sans progression (5,6 *versus* 3 mois) (Robert et al, 2013).

### **B. Transferts adoptifs de Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs amplifiés et traités in vitro par de l'IL-2**

Les premières études en matière d'immunothérapie ont été une source d'espoir pour le traitement du mélanome mais malheureusement cela a finalement conduit à un scepticisme des cliniciens pour cet axe thérapeutique. Les travaux du Pr. Rosenberg sur la stimulation par l'IL-2 de TIL de patients suivi de leur réinjection ont apporté de grandes perspectives (Mule et al, 1986; Rosenberg et al, 1990), mais n'ont pas été suivis d'effets favorables et immédiats (Rosenberg et al, 1990). Des injections systémiques d'IL-2 seule ont aussi été expérimentées, mais elles se sont révélées beaucoup trop

toxiques. Ces résultats décevants ont conduit à la nécessité de mettre en place des traitements immunologiques beaucoup plus spécifiques.

Les thérapies de transferts adoptifs avec des TIL autologues amplifiés et traités *in vitro* avec de l'IL-2 se sont aussi révélées globalement décevantes (Besser et al, 2010; Gattinoni et al, 2006) (Figure 5). L'équipe du Pr. B Dréno a procédé à plusieurs essais cliniques sur des patients atteints de mélanome de stade III (avec envahissement des ganglions lymphatiques et sans autres métastases détectées). Après résection des ganglions lymphatiques, les patients sont infusés avec des TIL additionnés d'IL-2 ou de l'IL-2 seule pendant deux mois. Ils ont montré que lorsqu'un seul ganglion lymphatique était envahi, le taux de rechute était significativement plus bas avec le traitement TIL plus IL-2 que IL-2 seule (33% contre 68%) (Khammari et al, 2014; Khammari et al, 2007).

L'inefficacité partielle, détectée lors de ces essais, s'avère être liée au microenvironnement immunosuppresseur de la tumeur notamment par la détection du marqueur prédictif Foxp3 caractérisant les lymphocytes T régulateurs (Treg). Cette immunosuppression rend inefficace les TIL injectés aux patients et cela même si leur activité anti mélanome a été vérifiée *ex vivo* (Disis, 2010). Par conséquent, l'utilisation de thérapies bloquant les populations immunosuppressives devrait améliorer l'efficacité des transferts adoptifs de TIL et apporter des bénéfices cliniques pour ces patients.

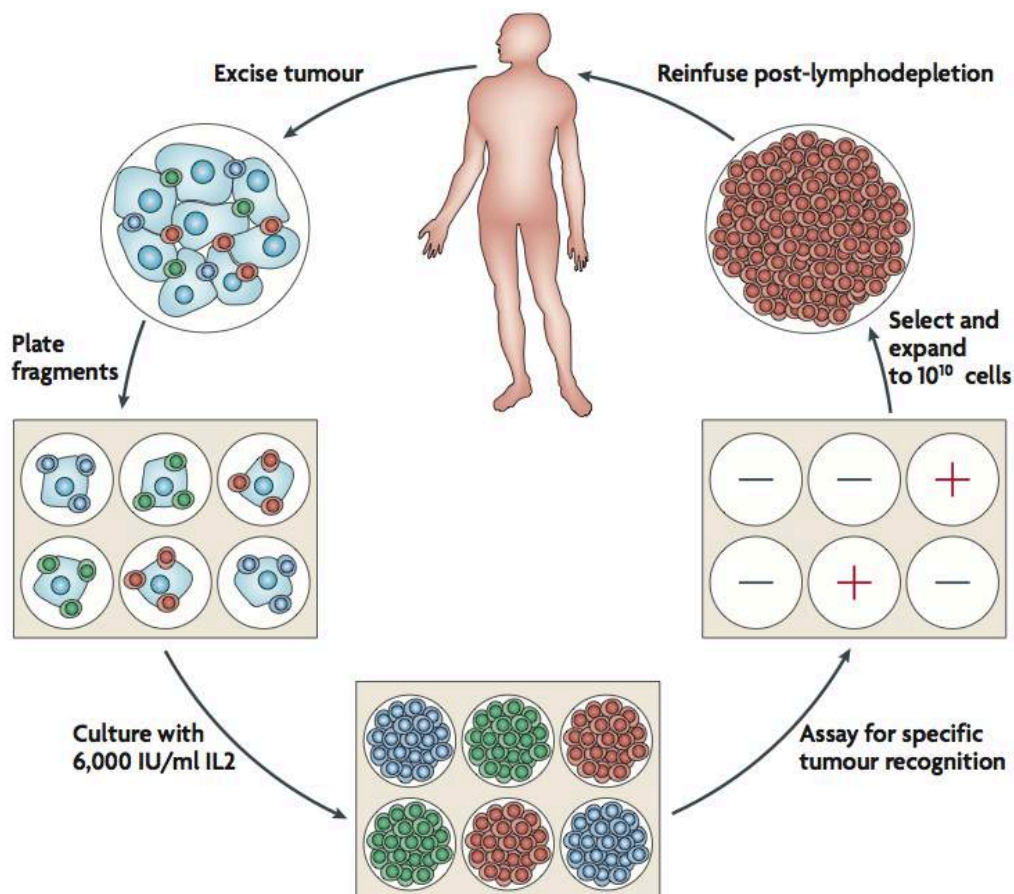
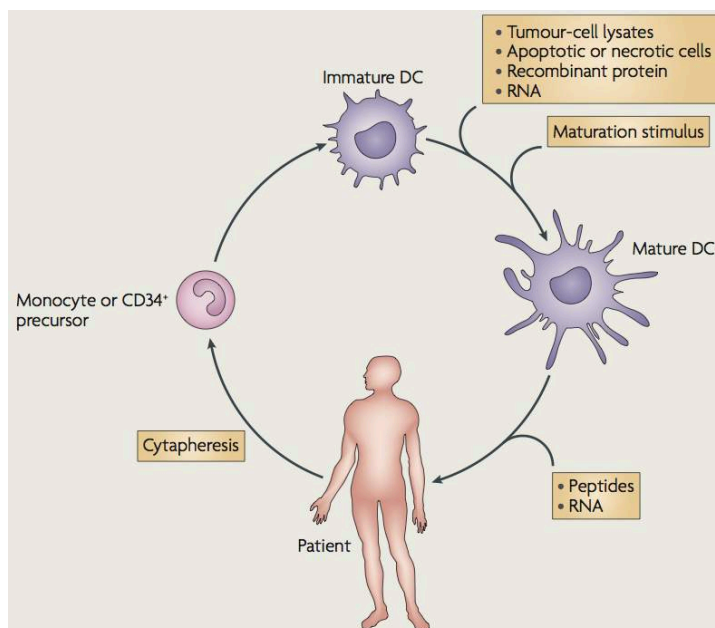


Figure 5 : Transfert adoptif de TIL autologues (adapté de (Rosenberg et al, 2008))

### ***C. Les stratégies vaccinales avec les cellules dendritiques***

Différentes stratégies vaccinales ont aussi été évaluées. Ces vaccins reposent sur des peptides antigéniques spécifiques des mélanomes, injectés seuls ou présentés par des Cellules Dendritiques (CD). Ces protocoles sont difficiles à mettre en place car ils nécessitent des moyens logistiques conséquents mais ils apportent des succès certains (Aarntzen et al, 2013; O'Neill et al, 2004) (Figure 6). En effet, un essai clinique de phase III réalisé avec un vaccin composé du peptide gp100 modifié en combinaison avec des injections systémiques d'IL-2 a montré une amélioration de la réponse clinique de 10% par rapport à des injections d'IL-2 seule (Schwartzentruber et al, 2011). La survie sans progression est améliorée (2,2 mois versus 1,6 mois) ainsi que la survie globale qui montre une tendance en faveur du vaccin combiné à l'IL-2 (17,8 mois) en comparaison à l'IL-2 seul (11,1 mois). De plus, un essai clinique de phase I/II montre que des injections de CD pulsées avec le lysat tumoral autologue et du KLH (keyhole limpet hémocyanine), combinées à des injections sous-cutanées d'IL-2 à faibles doses ont permis d'obtenir des réponses cliniques à la vaccination. (Ridolfi et al, 2011). Ainsi sur les 24 patients inclus dans l'essai clinique, deux ont fait une rémission complète, deux des rémissions mixtes, cinq des rémissions partielles et enfin cinq patients ont stabilisé leur maladie. De plus pour les 14 patients qui ont répondu à la vaccination en développant une hypersensibilité différée au KLH la médiane de survie générale est de 21 mois, alors que celle des autres patients n'est que de 7 mois. Cette étude a aussi montré que la toxicité de la vaccination associée à l'IL-2 était faible et qu'elle favorise la réponse des patients à des traitements classiques qui leur sont faits après la vaccination.



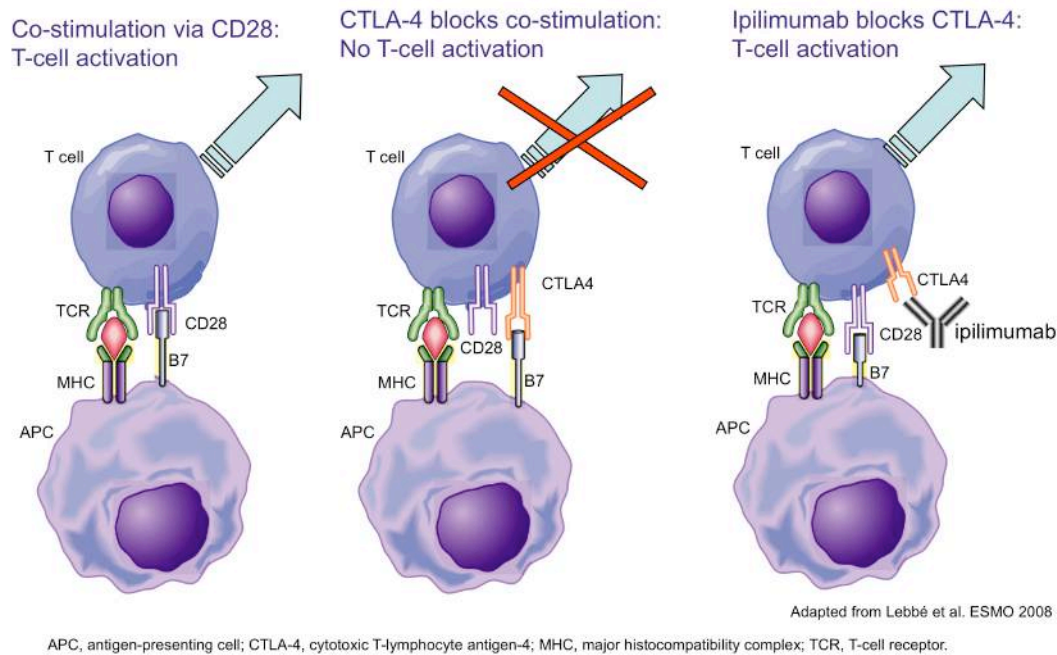
**Figure 6 : Protocoles de vaccination par les cellules dendritiques (CD) (adapté de (Tacke et al, 2007))**

#### **D. Les immunothérapies avec des anticorps anti-CTLA-4 et PD-1**

Une autre voie d'immunothérapie réalisée sur les patients porteurs de mélanomes repose sur le ciblage du volet immunosuppresseur de la réponse immune. En effet, des études ont montré que le microenvironnement du mélanome peut inhiber les réponses immunes anti mélanome notamment par l'intermédiaire de lymphocytes T régulateurs ou de molécules membranaires immunosuppressives (Bruchard & Ghiringhelli, 2014).

Des essais cliniques d'immunothérapie réalisés avec deux anticorps monoclonaux anti-CTLA-4, l'Ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) et le Tremelimumab (Pfizer), sont très prometteurs. CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) est un récepteur membranaire qui se trouve sur les cellules du système immunitaire et qui se lie aux ligands de costimulation CD80/CD86 exprimés sur les cellules présentatrices d'antigène et sur certaines cellules tumorales (Olive et al, 2011) (Figure 7). CD28 est un autre récepteur membranaire exprimé sur ces cellules du système immunitaire interagissant avec CD80/CD86 et agissant comme récepteur activateur de la réponse immune. CTLA-4 entre en compétition avec CD28 et contrairement à ce dernier, la liaison de CTLA-4 sur CD80/CD86 entraîne l'inactivation de ces cellules immunes effectrices, CTLA-4 est donc un récepteur coinhibiteur. Ainsi, les anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 inhibent le volet inhibiteur de la réponse immune et permettent donc une activation optimale des LT (Figure 7). L'Ipilimumab a été utilisé en essai clinique de phase III en première ligne de traitement du mélanome métastatique seul ou en combinaison avec une vaccination contre le peptide gp100. Cet essai a montré une supériorité en terme de survie globale de l'Ipilimumab par rapport au vaccin seul (10,0 mois pour l'Ipilimumab et 6,4 mois pour la vaccination) (Hodi et al, 2010). Les résultats prometteurs de cette étude pilote ont été confirmés dans une seconde étude de phase III comparant l'Ipilimumab à la Dacarbazine (Phan et al, 2008; Robert et al, 2011). Depuis juin 2010 en Europe, l'Ipilimumab a obtenu une ATU, et depuis mars 2011 aux USA une AMM. Néanmoins, des études récentes mettent en évidence une forte induction de l'inflammation, potentiellement délétère, après traitement avec de l'Ipilimumab (Cheng et al, 2015).

Le deuxième anticorps anti-CTLA4, le Tremelimumab, n'a pas montré de bénéfice clinique dans un essai clinique de phase III chez des patients atteints de mélanomes avancés (Ribas et al, 2013). Par contre, il a été testé en combinaison avec de l'IFN- $\alpha$  et cette combinaison se montre prometteuse car elle entraîne une amélioration de 24% de taux objectifs de réponse (Tarhini et al, 2012).



**Figure 7 : Ciblage de la voie CTLA-4 par l'anticorps thérapeutique Ipilimumab (adapté de Lebbé et al., EMSO, 2008)**

La protéine PD-1 (Programmed Death-1) est un autre récepteur coinhibiteur de l'activité des LT. Il possède deux ligands PD-L1 et PD-L2 qui sont souvent exprimés par les tumeurs ou par des cellules présentes dans leur microenvironnement (Mamalis et al, 2014) (Figure 8. Le Nivolumab est un anticorps monoclonal spécifique de PD-1 qui inhibe l'interaction PD-1/PD-L1.

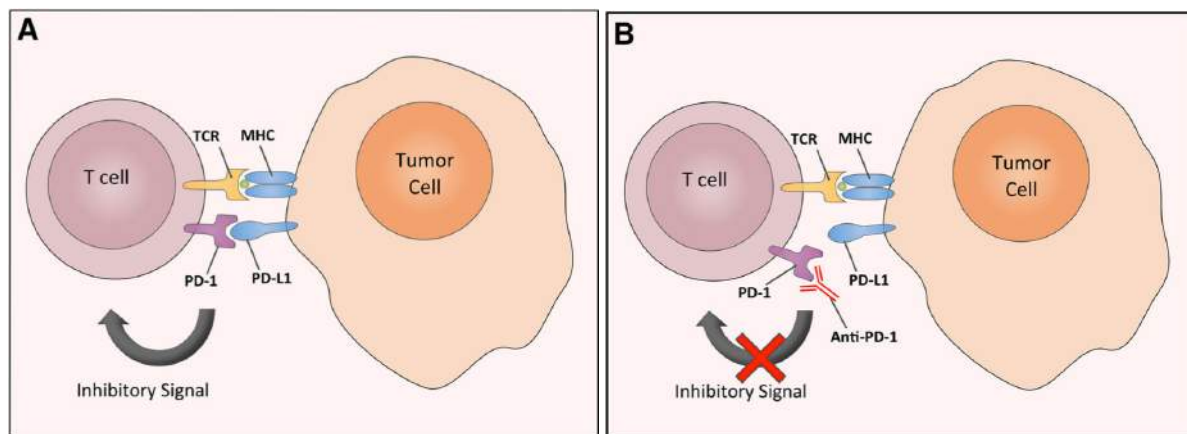
Les essais cliniques de phase I ont montré des résultats bénéfiques importants du Nivolumab dans le mélanome. Le taux de réponse était de 31% avec des effets durables chez la plupart des patients après un an de traitement (Topalian et al, 2014). Les taux de survie à 1 an et 2 ans sont de 62% et 43% respectivement, avec une médiane de survie globale de 16,8 mois. 27% des patients restent sans progression de la maladie 2 ans après le traitement. Cependant 22% des patients ont subi des effets secondaires de grade 3/4. Le Nivolumab a bénéficié d'une procédure accélérée d'autorisation de mise sur le marché (moins de 3 mois après le dépôt du dossier) du fait des résultats significatifs en termes d'efficacité et de sécurité.

Un large essai clinique de phase III a comparé les bénéfices du Nivolumab par rapport à ceux de la Dacarbazine chez des patients atteints de mélanome ne possédant aucune mutation pour BRAF. La survie globale à 1 an est de 72,9% pour le Nivolumab contre 42,1% pour la Dacarbazine. La médiane de survie sans progression est de 5,1 mois pour le Nivolumab contre 2,2 mois pour la Dacarbazine. Le taux de réponse objective est de 40% pour la Nivolumab contre 13,9% pour la Dacarbazine. Des effets secondaires de grade 3/4 ont eu lieu dans 11,7% des patients traités au Nivolumab contre 17,6% pour la Dacarbazine. Les résultats préliminaires de cet essai clinique ont montré un bénéfice du Nivolumab tellement évident et supérieur à celui de la Dacarbazine que l'essai clinique a été écourté et modifié de

façon à orienter les patients vers un traitement au Nivolumab. Ainsi, le Nivolumab a reçu une AMM de la FDA en décembre 2014 et une ATU en France qui a pris effet le 5 janvier 2015 pour des patients atteints d'un mélanome de stade III ou IV.

Un autre essai clinique de phase III a montré que le Nivolumab apportait un bénéfice clinique chez les patients ayant rechuté après un traitement à l'Ipilimumab ou aux inhibiteurs de BRAF (WEBER 2015). Ces résultats ont orientés l'administration du Nivolumab comme thérapie de seconde ligne.

Le Pembrolizumab est un autre anticorps monoclonal dirigé contre PD-1. Il a aussi reçu une AMM de la FDA et une ATU en France en 2014 pour les patients atteints d'un mélanome préalablement traités à l'Ipilimumab ou aux inhibiteurs de BRAF.



**Figure 8 : Ciblage de la voie PD-1 par l'anticorps monoclonal Nivolumab (Mamalis et al, 2014)**

Une étude récente de preuve-de-concept (Wolchok et al, 2013) a démontré que l'utilisation combinée des anticorps monoclonaux Ipilimumab et Nivolumab induit une réduction tumorale rapide chez 50% des patients atteints de mélanome avancé. Ces travaux apportent un rationnel solide pour la mise en place d'une thérapie anti mélanome combinée. Des résultats préliminaires et encourageants d'un essai clinique de phase II concernant la combinaison des deux anticorps ont été récemment annoncés au congrès ESMO de 2014. Sur une cohorte de 41 patients, la combinaison du Nivolumab et de l'Ipilimumab montre des effets bénéfiques précoces et durables avec des taux de survie globale de 80% à 2 ans. Ces résultats sont d'ailleurs sans précédent dans les essais cliniques sur le mélanome à cohorte et durée équivalente.

Le mélanome pose un vrai problème de santé publique à cause de son incidence croissante et de l'inefficacité globale des traitements lorsqu'il est métastatique c'est pourquoi de nombreuses études sont effectuées à l'heure actuelle pour améliorer de façon significative la survie des patients. Deux principales voies sont étudiées : les thérapies ciblées de la protéine BRAF mutée en position V600E et les immunothérapies avec les anticorps dirigés contre le volet inhibiteur de la réponse immune anti tumorale (anti-CTLA-4, anti-PD-1). Ces thérapies sont prometteuses, en particulier les immunothérapies car les chimiothérapies ciblées sont restreintes à certains patients. A l'avenir, pour

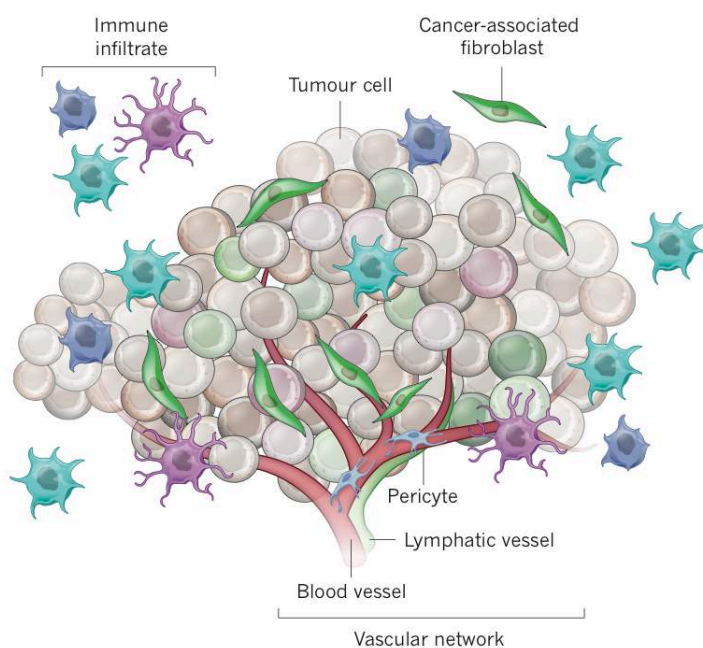
avoir une amélioration significative de la survie des patients, il faudra certainement faire des combinaisons de différentes thérapies (immunothérapie et chimiothérapie ou immunothérapie et radiothérapie), mais il faudra aussi trouver de nouvelles voies thérapeutiques.



## CHAPITRE 2 – LES REPONSES IMMUNES

### I. Généralités

De nos jours, il est reconnu que le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur en contrôlant le développement des cellules cancéreuses. Divers types cellulaires coexistent dans ce microenvironnement tumoral. Les cellules tumorales sont entourées essentiellement de vaisseaux sanguins, de matrice extracellulaire, de fibroblastes et de diverses cellules immunes (Junttila & de Sauvage, 2013) (Figure 9).



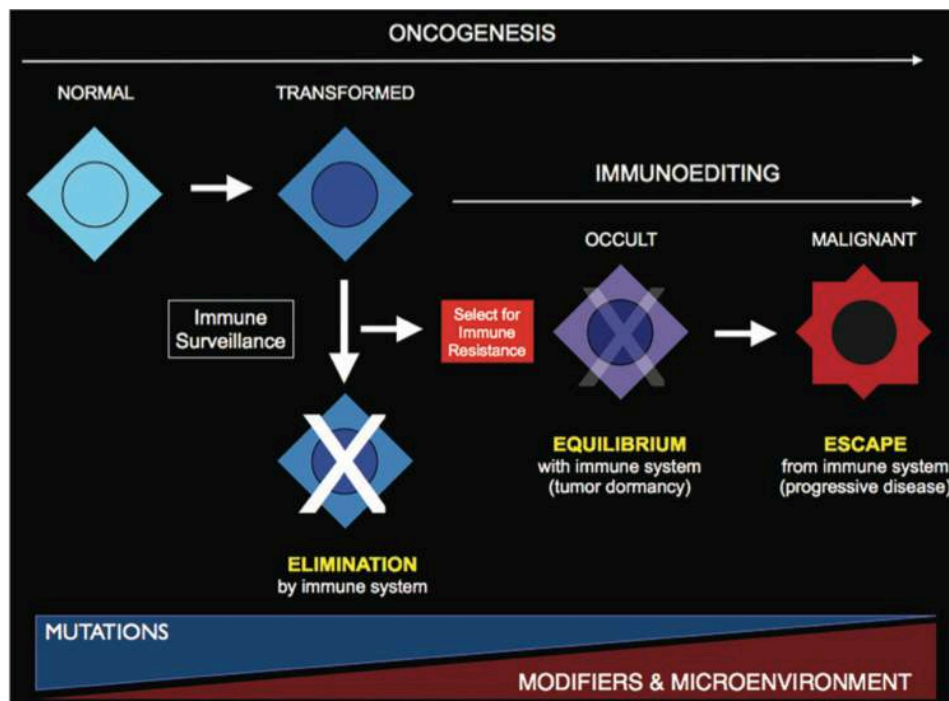
**Figure 9 : Le microenvironnement tumoral (Junttila & de Sauvage, 2013)**

Je me suis intéressé au cours de ma thèse à la composante immune de ce microenvironnement. De nombreuses études récentes ont montré que les tumeurs de différentes origines possèdent des potentiels immunogènes plus ou moins importants. Le mélanome fait partie des tumeurs immunogènes qui sont capables de déclencher des réponses immunes visant à les éliminer. Ces réponses immunes sont la synthèse de deux tendances opposées. En effet, l'immunologie des tumeurs repose sur deux versants essentiels et inverses: la surveillance immunitaire des cellules tumorales et les mécanismes d'évasion permettant à ces cellules d'échapper à la destruction immune.

L'idée que le système immunitaire (SI) peut contrôler le développement tumoral est très ancienne mais elle est longtemps restée sujette à débat. En 1909, Paul Ehrlich fut probablement le premier à suggérer que des cellules tumorales se développeraieent régulièrement mais seraient contrôlées par le système immunitaire. Il aura fallu une longue période d'études préliminaires pour que le concept d'immunosurveillance émerge en 1970, suite aux travaux de Burnet (Burnet, 1957; Burnet, 1972).



L'émergence de modèles murins immunodéficients (sur fonds génétiques purs) a permis de montrer que les souris déficientes en interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) (Dighe et al, 1994) ou en Recombination activated gene 2 (RAG2) (Shankaran et al, 2001) présentent une plus grande susceptibilité au développement tumoral. Ainsi, la surveillance immunitaire des tumeurs repose sur le fait que les cellules du Système Immunitaire (SI), en particulier les LT, sont impliquées dans un phénomène de surveillance de l'organisme contre le développement de tumeurs. Les LT exercent cette surveillance en reconnaissant les cellules néoplasiques comme étrangères grâce à l'expression d'antigènes tumoraux à leur surface et à leur élimination à un stade précoce. Selon le concept d'immunosurveillance, les tumeurs ne se développent que lorsque les cellules cancéreuses échappent au SI. Suite au concept d'immunosurveillance est apparu celui de l'immunoédition qui correspond à l'existence de mécanismes d'évasion permettant aux cellules tumorales ayant été reconnues par les effecteurs du SI d'échapper à la destruction immune (Prendergast, 2013) (Figure 10). Nous y reviendrons plus en détail dans le Chapitre 2 – Partie IX (page 52).



**Figure 10 : Modèle synthétique de l'immunosurveillance et de l'immunoédition (Prendergast, 2013)**  
 Lors de la tumorigénèse, les cellules transformées expriment des antigènes tumoraux reconnus par le système immunitaire permettant ainsi leur élimination : c'est l'immunosurveillance. L'évolution de la reconnaissance antigénique lors de l'immunoédition amène la tumeur vers un stade clinique de dormance ou d'équilibre où elle est contrôlée par le SI mais elle ne se développe pas. Finalement, cela aboutit à un échappement de la tumeur et à une progression de la maladie.

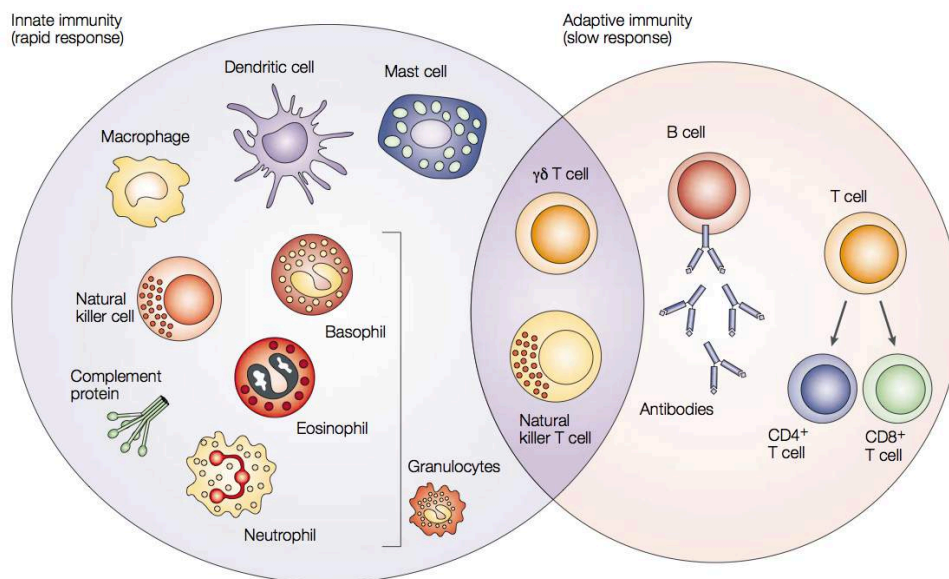
Plusieurs études ont confirmé que le SI joue effectivement un rôle dans la surveillance des tumeurs. En effet, une plus forte incidence des cancers est retrouvée chez les souris et des patients immunodéprimés (Silverberg et al, 2011; Zwald et al, 2010). Par exemple dans des situations d'immunosuppression liées à des greffes d'organe, l'incidence des cancers de la peau est plus élevée.

Les augmentations les plus fortes sont celles des sarcomes de Kaposi (84 fois) et des carcinomes à cellules squameuses (65 fois) (Jensen et al, 1999). Pour le mélanome, l'augmentation est modeste et varie selon les études de 2% à 8% (Zwald et al, 2010).

L'incidence des cancers est aussi augmentée chez les patients atteints du Sida. Ces incidences sont très fortement augmentées pour les lymphomes non Hodgkiniens (21,5%), les sarcomes de Kaposi (16%) et les cancers du poumon (9,4%) (Lanoy et al, 2011). L'augmentation de l'incidence du mélanome est moindre mais significative (environ 5%) (Silverberg et al, 2011).

Dans ce chapitre, nous allons présenter les différents effecteurs majeurs de la réponse anti tumorale.

Le système immunitaire est divisé en deux composantes : une réponse immunitaire innée suivie d'une réponse adaptative. C'est la coopération complexe des deux systèmes, par l'intermédiaire des cellules immunitaires qui les composent, qui permet de lutter contre les infections et d'éliminer des cellules cibles comme les cellules tumorales (Figure 11).



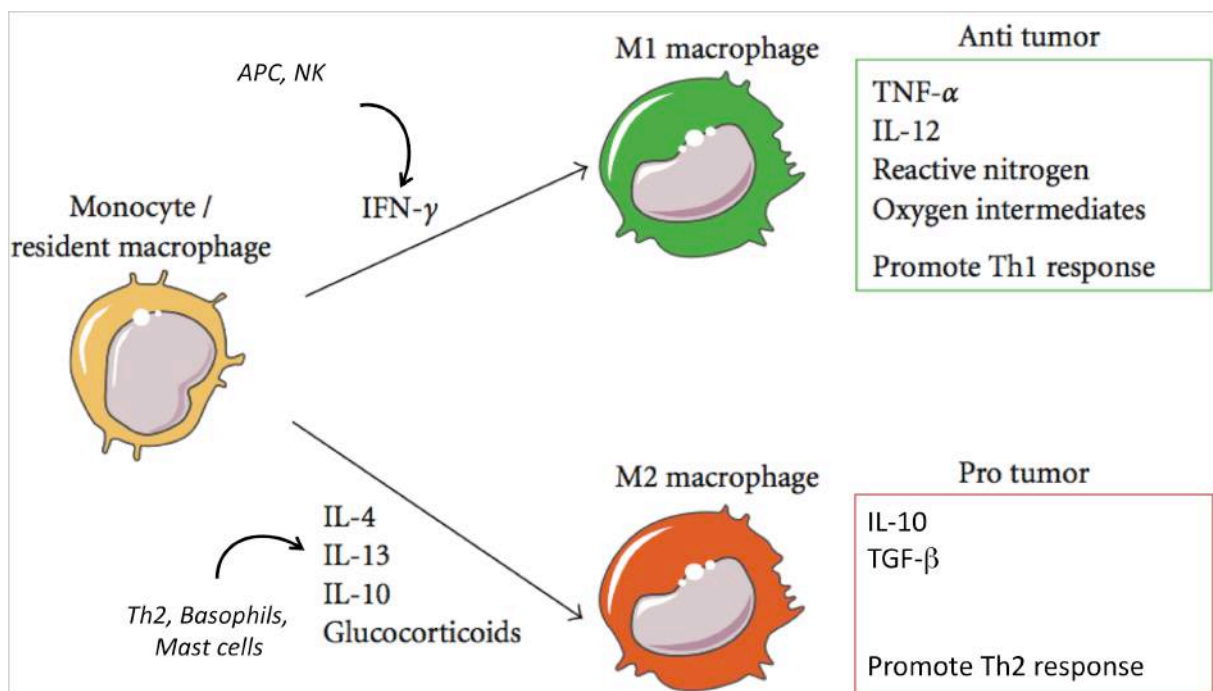
**Figure 11 : Cellules participant au système immunitaire inné et adaptatif (Dranoff, 2004)**

## **II. Le système immunitaire inné**

Le SI inné est la première ligne de défense de l'organisme. Différents effecteurs de ce système ont été répertoriés : les cellules inflammatoires (les granulocytes basophiles, éosinophiles, neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les mastocytes), les cellules Natural Killer, les cellules NKT, les Lymphocytes T $\gamma\delta$  et les Cellules Dendritiques (Cruvinel Wde et al, 2010).

Les **cellules inflammatoires** sont les premières cellules à intervenir lors d'agressions extérieures. Elles permettent la phagocytose d'éléments étrangers ou de cellules infectées ou tumorales.

Parmi ces cellules inflammatoires, les **macrophages** jouent un rôle essentiel dans le contrôle du développement tumoral (Biswas et al, 2013). Les macrophages sont très abondants dans les mélanomes et leur densité augmente avec l'épaisseur des tumeurs. Ils exercent un rôle important dans la présentation antigénique et l'éradication des cellules tumorales dans les phases précoces (Romieu-Mourez et al, 2006). A l'inverse, d'autres études ont montré que l'infiltrat d'un phénotype particulier de macrophages est associé à un mauvais pronostic dans les mélanomes, les cancers du pancréas ou du sein car une sous population de macrophages favorise le développement tumoral (Varney et al, 2005; Zhang et al, 2012a). Ainsi, le rôle des macrophages associés aux tumeurs (TAM) dépend du type de cancers et de leur phénotype qui se modifie dans le microenvironnement tumoral. Ces macrophages sont classés en deux types selon leur polarisation : le type M1 à activité anti tumorale et le type M2 à activité pro-tumorale (Noy & Pollard, 2014; Schmid & Varner, 2010) (Figure 12).



**Figure 12 : Macrophages M1 et M2 (adapté de (Schmid & Varner, 2010))**

Les monocytes (ou macrophages résidents) se différencient en macrophages M1 en présence d'IFN- $\gamma$ . Plusieurs mécanismes permettent aux macrophages M1 d'avoir une activité anti tumorale : ils sécrètent du TNF- $\alpha$ , de l'IL-12 et des ROS (Reactive Oxygen Species) et favorisent les réponses immunes de type Th1. Au contraire, les macrophages M2 se développent à partir des monocytes en présence de IL-4, -13, -10. Ces macrophages M2 favorisent le développement tumoral en sécrétant de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  et en favorisant la réponse immune de type Th2.

Le récepteur des **lymphocytes LTy $\delta$**  (aussi appelés non conventionnels) (TCR) est composé des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  (Marquez-Medina et al, 2012). Ce récepteur leur permet de reconnaître les antigènes non peptidiques, comme des phospho-antigènes, exprimés à la surface des cellules tumorales. Ils participent au contrôle immun du développement tumoral grâce à une activité cytotoxique importante dépendante du TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) et de l'IFN- $\gamma$ .

Les **cellules T Natural Killer (NKT)** sont des  $LT\alpha\beta$  possédant également des caractéristiques de cellules NK et un récepteur TCR dont la particularité est de reconnaître différents antigènes non peptidiques (Terabe & Berzofsky, 2014). Elles reconnaissent des glycolipides tumoraux présentés par le CD1d. L'activation des cellules NKT génère une forte sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui favorise l'activation des cellules NK et des LT CD8<sup>+</sup> ou encore une forte production d'IL-4 pour l'activation des Th2 dans les réponses aux allergies (Akbari et al, 2003).

D'autres cellules de l'immunité innée sont importantes pour le développement tumoral et en particulier des mélanomes, il s'agit des **cellules myéloïdes suppressives** (Myeloid-Derived Suppressive Cells, MDSC). Les cellules myéloïdes sont constituées d'une population cellulaire hétérogène. Elles sont recrutées dans les tumeurs où elles jouent un rôle pro-tumoral en inhibant la fonction des cellules immunes effectrices cytotoxiques par la production de Tumor Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et de l'IL-10 (Filipazzi et al, 2012; Lengagne et al, 2011; Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2009).

Enfin, les acteurs principaux du SI inné sont les **cellules NK**. Ce sont des lymphocytes qui ont une double activité cytotoxique : à la fois directe et pro-inflammatoire par sécrétion de cytokines. Leurs caractéristiques seront détaillées dans un paragraphe qui leur sera consacré plus loin dans ce chapitre (page 31).

### Les **Cellules Dendritiques (CD)**

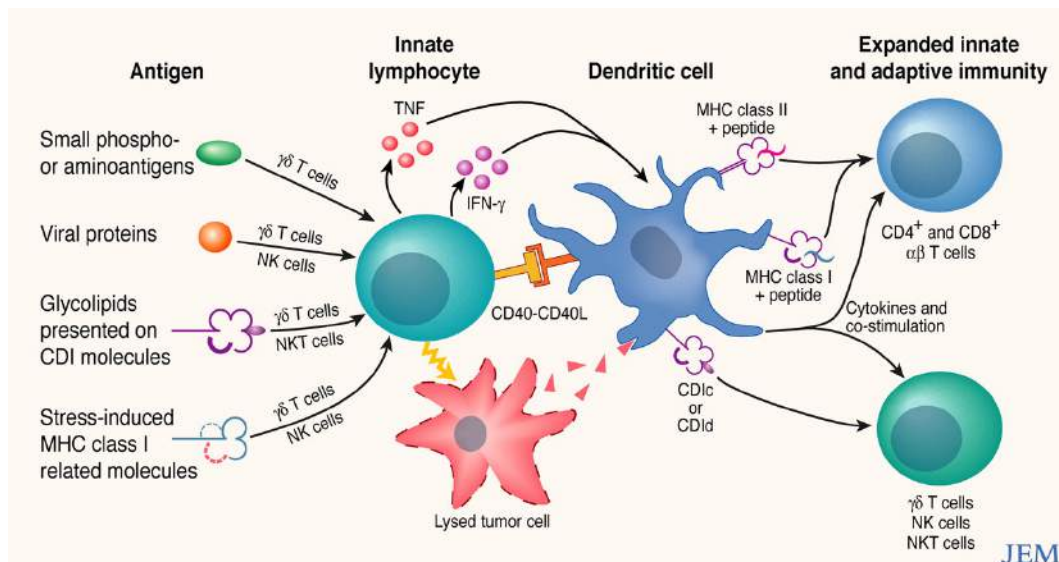
Pour induire des réponses immunes spécifiques, les antigènes doivent être présentés aux LT CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> par des molécules du CMH-I ou CMH-II respectivement. Parmi les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), les cellules dendritiques (CD11c<sup>+</sup>) sont les plus performantes : elles ont la capacité d'activer des LT naïfs et d'induire des réponses humorales et cytolytiques par leur présentation d'antigènes par les CMH-I ou -II. Les étapes du catabolisme de l'antigène sont corrélées aux stades de maturation des CD : seules les CD immatures, concentrées dans les tissus périphériques, peuvent phagocytter et provoquer l'endocytose des antigènes solubles et particuliers. A ce stade les CD ne peuvent pas présenter les antigènes aux LT car leurs molécules du CMH sont retenues dans les lysosomes. Des signaux inflammatoires (TNF- $\alpha$  ou IL-1) ou du LPS et l'interaction CD40-L/CD40 provoquent la maturation des CD (Blanco et al, 2008). Cette maturation entraîne l'expression de CD83 sur les CD, des changements morphologiques, une relocalisation des CMH à la membrane, l'expression de molécules de costimulation et leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires ganglions et la rate, principalement.

Les CD servent de sentinelles pour détecter une agression et se situent ainsi à l'interface entre le système inné et le système adaptatif.

Dans le SI inné, Les cellules dendritiques reconnaissent les microorganismes grâce à des immunorécepteurs pour certains motifs moléculaires conservés communs aux microorganismes : les PAMP (Pathogen-Associated Microbia Pattern). Les PAMP peuvent être reconnus par plusieurs types de récepteurs comme les TLR (Toll-like Receptors), les récepteurs du groupe des lectines de type C (CLR) ou les récepteurs NLR (Nucleotide oligomerization domain receptor). Ces récepteurs sont spécifiques de divers motifs moléculaires comme des composants des parois bactériennes (lipopolysaccharides (LPS)), de l'ADN bactérien ou de l'ARN viral double brin ou des glycoprotéines. Après reconnaissance de leurs ligands, ces récepteurs délivrent des signaux moléculaires distincts engendrant un type différent d'activation des CD et donc une réponse immunitaire adaptée au danger identifié (Akira & Takeda, 2004).

Dans le SI adaptatif, les CD sont spécialisées dans la présentation des antigènes (Cruvinel Wde et al, 2010). En première ligne, elles phagocytent des agents infectieux, des cellules infectées ou tumorales (Munz et al, 2005). Ensuite, elles « apprêtent » ces protéines et les découpent en peptides. Puis elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent ces peptides aux lymphocytes TCD8+ et TCD4+ grâce à leurs molécules du CMH-I et du CMH-II respectivement (Guermontprez et al, 2002). Il existe différentes voies d'apprêtement. La voie cytosolique permet de présenter des peptides endogènes, souvent cytosoliques, issus de protéines nouvellement synthétisées, cellulaires ou virales sur les CMH-I. La voie endosomale permet de présenter des antigènes internalisés par phagocytose ou endocytose puis de présenter ses peptides exogènes sur le CMH-II. Enfin la présentation croisée est une voie endosomale exploitée pour la présentation de peptides exogènes sur les molécules du CMH-I. La présentation croisée (cross presentation) consiste à acquérir des antigènes exogènes provenant de tissus infectés ou de cellules tumorales et de présenter les peptides qui en dérivent sur les CMH-I aux LT CD8+ (Joffre et al, 2012). Pour cela les antigènes doivent sortir des endosomes pour rejoindre la voie conventionnelle de présentation des peptides par les CMH-I, qui se déroule dans le réticulum endoplasmique et qui implique l'activité des transporteurs de peptides TAP1 et TAP2 ainsi qu'un complexe protéasome fonctionnel. Cette présentation croisée est globalement inefficace *in vitro*. Les CD matures expriment fortement des molécules de costimulation ce qui permet aux LT CD8+ et CD4+ de s'activer (Figure 13). Les molécules de costimulation seront décrites dans le Chapitre 2 – Partie VI (page 46). Enfin, les CD interviennent aussi dans l'activation des cellules NK.

En fonction des signaux captés en périphérie, les CD peuvent sécréter différentes cytokines qui orienteront les LT vers un profil de différenciation spécifique. Les LT CD4+ naives se différencient en cellules Th1 productrices d'IFN- $\gamma$  en réponse à la sécrétion d'IL-12 par CD. L'orientation des LT vers un phénotype Treg est provoquée par la sécrétion de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  par les CD (Blanco et al, 2008).



**Figure 13 : Les cellules dendritiques à l'interface entre le système immunitaire inné et adaptatif (Munz et al, 2005)**

Les cellules dendritiques détectent des cellules ou des molécules du non-soi et les phagocytent. Elles les dégradent en peptides qu'elles présentent ensuite aux LT CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> grâce à leurs molécules de CMH-I ou CMH-II respectivement.

### III. Le système immunitaire adaptatif

Le SI adaptatif constitue la deuxième ligne de défense de l'organisme. Il s'active après reconnaissance spécifique des antigènes et il permet le développement d'une mémoire immune. Les cellules effectrices du SI adaptatif sont les lymphocytes T et B (Mesquita Junior et al, 2010).

Les **Lymphocytes T** possèdent tous un récepteur TCR $\alpha\beta$ /CD3. Ils sont divisés en trois groupes principaux. Les LT auxiliaires CD4<sup>+</sup> qui interviennent dans l'activation des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs grâce à la sécrétion de cytokines et à la costimulation par les récepteurs coactivateurs. Les LT CD8<sup>+</sup> correspondent aux lymphocytes effecteurs cytotoxiques. Les lymphocytes T régulateurs sont des cellules immunosuppressives qui régulent négativement les LT CD8<sup>+</sup>. Les caractéristiques des différents LT seront détaillées plus loin dans ce chapitre.

Les **Lymphocytes B** sont les cellules responsables de la réponse humorale via la production d'anticorps (Ac) spécifiques. Au cours de la maturation des LB, les cellules se transforment en plasmocytes sécréteurs d'Ac spécifiques. Au cours du développement tumoral, certains LB porteurs d'un récepteur antigénique spécifique d'antigènes tumoraux se transforment en plasmocytes et sécrètent des Ac spécifiques dirigés contre la tumeur (DiLillo et al, 2010a). Ces Ac participent à la lyse des cellules tumorales en activant le complément ou en se fixant *via* leur fragment constant (Fc) aux récepteurs adéquats des macrophages ou des cellules NK. Cette fixation permet à ces cellules d'avoir une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (Antibody Dependant Cell Cytotoxicity, ADCC) favorisant la lyse tumorale (Biburger et al, 2014; DiLillo et al, 2010b).

#### **IV. Les cellules NK**

##### **1. Description**

Les cellules NK sont des lymphocytes de grande taille, qui représentent 5% à 15% des cellules mononucléées du sang périphérique chez l'homme. Elles sont surtout présentes dans le sang, la rate et la moelle osseuse et elles ne migrent vers les tissus périphériques que lors des inflammations. Chez l'Homme, la majorité des cellules NK expriment les récepteurs CD16 et CD56 mais pas le récepteur CD3 qui est caractéristique des LT. Les cellules NK constituent la première ligne de défense contre les organismes étrangers et les tumeurs (Vivier et al, 2008).

Chez l'Homme, les cellules NK sont divisées en deux sous-groupes. 90% de ces cellules possèdent le phénotype CD56dim/CD16+, elles sont cytotoxiques, ont un contenu cellulaire granuleux et sont présentes majoritairement dans le sang, la rate et aux sites d'inflammation. Les 10% restants sont CD56bright/CD16- : elles ont des activités immuno-modulatrices par sécrétion des cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-13, IL-10) et sont localisées dans les ganglions lymphatiques (Bryceson et al, 2006).

Les cellules NK sont à l'interface entre le SI inné et du SI adaptatif car elles participent à la mise en alerte de l'immunité adaptative. D'une part, elles lysent les cellules reconnues comme du « non-soi » ou du « soi altéré ». D'autre part, elles collaborent avec les CD et participent à leur maturation par la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ . Cette collaboration est réciproque puisque les CD permettent l'activation des cellules NK via une production d'IL-12 (Ferlazzo & Morandi, 2014).

##### **2. Balance des signaux**

L'activité des cellules NK est extrêmement régulée car elle dépend d'une balance de signaux de deux types. Les signaux inhibiteurs sont induits par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH-I). Les signaux activateurs dépendent de différents ligands exprimés par les cellules infectées ou les cellules tumorales (Barreira da Silva & Munz, 2011).

Ces signaux sont reconnus par leurs récepteurs membranaires respectifs. Les récepteurs activateurs sont essentiellement de trois types : les Natural Cytotoxic Receptors (NCR), DNAX Accessory Molecule-1 (DNAM-1) et NK Group 2 member D (NKG2D). Leurs structures protéiques présentent toutes des motifs identiques nommés : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM). Le récepteur NKG2D est l'un des récepteurs activateurs les plus étudiés. Il sera décrit plus en détail en page 33. Les récepteurs inhibiteurs présentent des motifs Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (ITIM). Il en existe plusieurs types : les Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs) chez l'homme et Lectin-like Ly49 chez les rongeurs qui reconnaissent les molécules du CMH-I, ainsi que les récepteurs CD94/NK Group 2 member A (NKG2A).

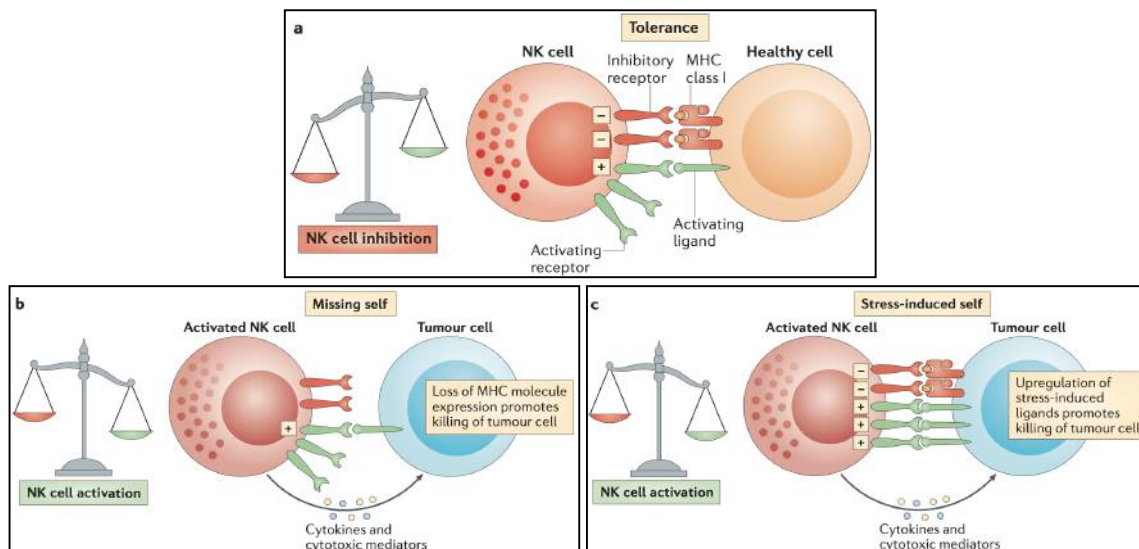


### 3. Activation des cellules NK

Les cellules NK sont activées en réponse à des cytokines produites pendant l'inflammation ou lors de la détection de cibles cellulaires reconnues comme du « non-soi ». Lorsque la balance de signaux est en faveur des ligands activateurs, les cellules NK sont activées, prolifèrent et deviennent cytotoxiques. Elles sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  et le GM-CSF (Bryceson et al, 2006; Vivier et al, 2012) (Figure 14). Cette balance en faveur de l'activation survient aussi en absence de molécules de CMH-I qui sont des ligands des récepteurs inhibiteurs. La dérégulation des CMH-I est un mécanisme d'échappement tumoral fréquent auquel s'opposent les cellules NK.

Quand la balance des signaux intégrés par les cellules NK est majoritairement activatrice, deux phénomènes ont lieu. D'une part, une activité cytotoxique est mise en place par dégranulation dans le milieu extracellulaire des vésicules contenant des perforines et des granzymes B sécrétées par les cellules NK cytotoxiques CD56dim/CD16+ ou par expression du ligand inducteur d'apoptose FasL. De plus, dans ces conditions d'excès de signaux activateurs, les cellules NK immuno-modulatrices CD56bright/CD16- relarguent des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF) (Cullen et al, 2010; Trapani & Smyth, 2002).

A l'inverse, si les signaux inhibiteurs sont majoritaires, comme c'est le cas en présence de cellules saines, qui expriment les molécules de CMH-I autologues, l'activation et la fonction cytotoxique des cellules NK sont bloquées ainsi que leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Figure 14).



**Figure 14 : La balance d'intégration des signaux activateurs et inhibiteurs des cellules Natural Killer (Vivier et al, 2012)**

(a) Les cellules NK sont tolérantes aux cellules saines tant que les signaux inhibiteurs (comme les CMH-I) reçus sont plus importants que les signaux activateurs. (b) Les cellules tumorales peuvent perdre l'expression du CMH-I. Les cellules NK sont alors activées car elles ne reçoivent plus le signal inhibiteur généré par le CMH-I. (c) Suite à un stress cellulaire, les cellules tumorales peuvent surexprimer les ligands activateurs de NK. Les signaux activateurs dominent alors sur les signaux



*inhibiteurs et les cellules NK sont activées. Dans les deux derniers cas, l'élimination des cellules tumorales par les cellules NK se fait par cytotoxicité directe ou par production de cytokines pro-inflammatoires.*

De plus, les cellules NK répondent aussi à de nombreuses cytokines comme l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15 et les interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ), qui augmentent leurs capacités lytiques, sécrétoires et prolifératives ainsi que leur potentiel anti tumoral (Walzer et al, 2005).

#### **4. Le récepteur NKG2D et ses ligands**

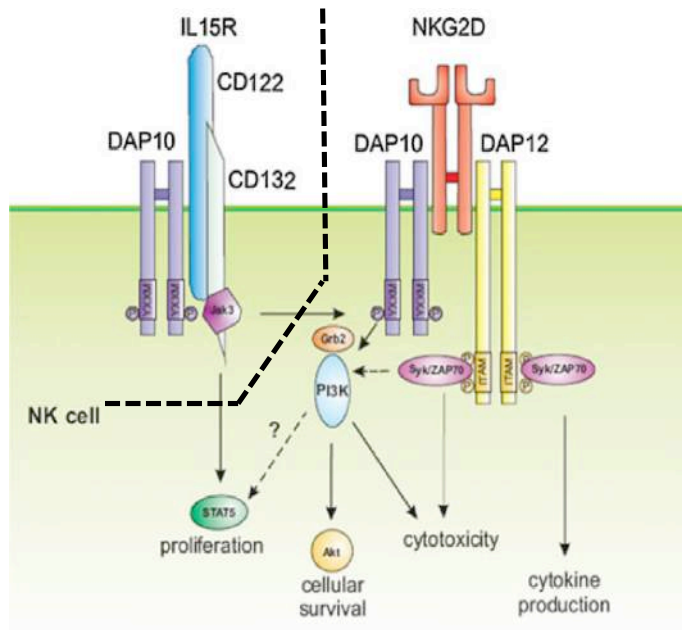
##### **A. Le récepteur NKG2D : structure, signalisation et fonction**

Chez l'Homme, NKG2D est exprimé sur toutes les cellules NK et tous les LT CD8+  $\alpha\beta$ . Il est également retrouvé à la surface de la plupart des cellules NKT et LT $\gamma\delta$ . Chez la souris, NKG2D est exprimé sur toutes les cellules NK, la plupart des cellules NKT et LT $\gamma\delta$ , comme chez l'Homme. Toutefois, il n'est exprimé que sur les LT CD8+  $\alpha\beta$  activés et mémoires et par sur les LT CD8+ non activés.

NKG2D est impliqué dans la surveillance de nombreux processus : infections virales, transformations cancéreuses, maladies auto-immunes et réactions lors des transplantations d'organes. Il joue un rôle clé dans la régulation de la cytotoxicité des cellules NK (Zafirova et al, 2011). L'activation du récepteur NKG2D est essentielle dans l'immunosurveillance des tumeurs car des souris déficientes en NKG2D meurent précocement de cancers variés, majoritairement des lymphomes (Guerra et al, 2008). Ce récepteur une glycoprotéine transmembranaire de type II comportant un domaine C-type lectin. Il est exprimé sous forme d'homodimères, contrairement aux autres membres de la famille NKG2. Son domaine intracellulaire est court et sans possibilité de transduction du signal. De ce fait, NKG2D forme un complexe hexamérique avec les protéines adaptatrices DAP10 (chez l'homme et la souris) ou DAP12 (chez la souris) (DNAX-activation protein 10 ou 12), qui elles sont capables de transduire les signaux d'activation dans les cellules NK (Lanier, 2008; Zafirova et al, 2011) (Figure 15).

DAP10 est une protéine adaptatrice de 10 kDa, présentant un motif YINM qui après phosphorylation permet le recrutement de Grb2/Vav1 et de la PI3K (PhosphoInositide 3 Kinase) (Zafirova et al, 2011). Cette signalisation promeut la survie et la cytotoxicité dans les cellules NK, et la costimulation dans les LT. DAP12 est une protéine adaptatrice de 12 kDa, possédant un domaine de déphosphorylation ITAM qui recrute ZAP70 (Zeta-chain (TCR) Associated Protein kinase 70kDa) et Syk (Spleen tyrosine kinase). Cette signalisation permet le relargage de cytokines et favorise la cytotoxicité des cellules NK (Bryceson et al, 2006) (Figure 15).

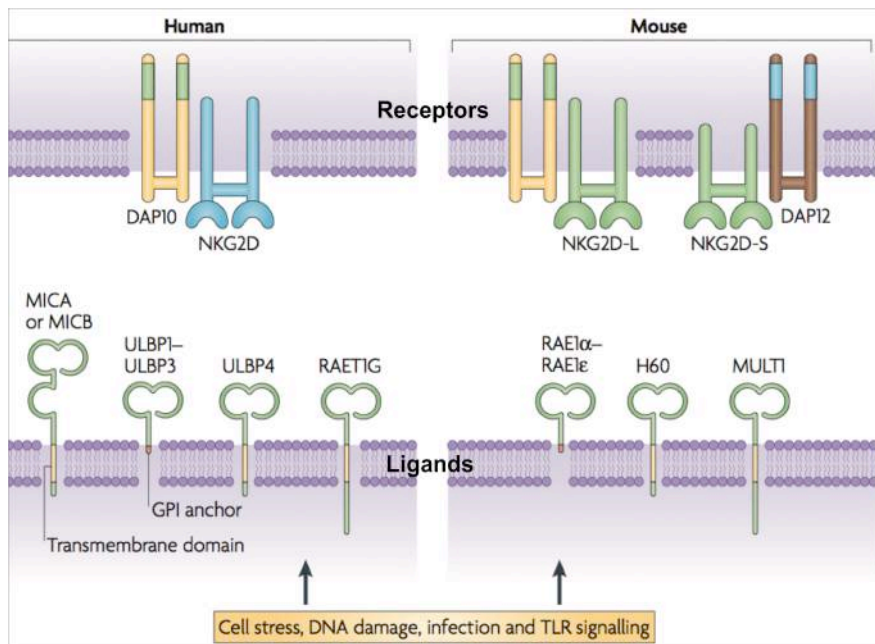
Des travaux récents montrent que la signalisation induite par NKG2D/DAP est amplifiée par celle induite par le récepteur à l'IL-15 qui est nécessaire au développement et à la survie des cellules NK (Horng et al, 2007; Zafirova et al, 2011) (Figure 15).



**Figure 15 : La signalisation couplée entre l'activation par le récepteur NKG2D et le récepteur à l'IL-15 (Zafirova et al, 2011)**

### **B. Les ligands de NKG2D**

NKG2D possède plusieurs ligands qui ont tous des structures proches de celle du CMH-I. Chez l'Homme, ce sont les MHC class I Chain-related proteins A and B (MICA, MICB), les Unique-Long Binding Proteins 1-4 (ULBP1-4) aussi appelées Retinoic Acid Early-inducible Transcript (RAET1I, 1H, 1N, 1E), et RAET1G (Eagle & Trowsdale, 2007). Chez la souris, trois ligands sont actuellement identifiés : le Retinoic Acid Early-inducible 1 (RAE-1), le Murine ULBP-like Transcript 1 (MULT1) et l'antigène mineur d'histocompatibilité H-60 (Eagle & Trowsdale, 2007; Nausch & Cerwenka, 2008) (Figure 16). Tous ces ligands sont activateurs mais c'est la différence d'affinité de ces divers ligands pour NKG2D qui expliquerait les niveaux d'activation variables du récepteur et par conséquent des cellules NK. MULT1 est le ligand murin le plus affiné pour NKG2D, et chez l'Homme, c'est le polymorphisme de la protéine MICA qui permet de modifier plus efficacement cette affinité (Carayannopoulos et al, 2002; Steinle et al, 2001).



**Figure 16 : Le récepteur NKG2D et ses ligands chez l'homme et la souris (Eagle & Trowsdale, 2007)**

#### a. Le ligand RAE-1

RAE-1 est le ligand murin de NKG2D le plus étudié. Il possède 5 isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). C'est une protéine de 24 kDa fixée à la membrane plasmique par une ancre Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI). RAE-1 est temporairement exprimé lors du développement embryonnaire. Mais il est réexprimé sur de nombreuses tumeurs telles que des lymphomes, des myélomes et des lignées de carcinomes (Diefenbach et al, 2000). L'expression de RAE-1 est régulée par l'acide rétinoïque (d'où son nom), mais également par des dommages à l'ADN (Cerboni et al, 2014). RAE-1 est un antigène tumoral intéressant car Diefenbach et ses collaborateurs (Diefenbach et al, 2001) ont montré qu'il est impliqué dans le rejet des tumeurs *via* l'action des cellules NK.

#### b. Le ligand MICA

MICA est le ligand humain de NKG2D le plus étudié. Cette protéine transmembranaire (43 kDa) possède un fort polymorphisme puisque 65 allèles ont été identifiés à ce jour (Cerwenka & Lanier, 2003; Choy & Phipps, 2010). MICA est exprimé de façon physiologique uniquement à la surface des cellules épithéliales intestinales (Groh et al, 1999). Elle est surexprimée à la surface de nombreuses tumeurs dont le mélanome (Pende et al, 2002; Vetter et al, 2002). L'expression de MICA est régulée de façon transcriptionnelle mais également traductionnelle. Les Heat-Shock proteins, l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$ , les micro-ARN ou encore les dommages à l'ADN sont impliqués dans cette régulation (Elsner et al, 2010) (Schwinn et al, 2009; Zhang et al, 2008) (Yadav et al, 2009) (Cerboni et al, 2014). MICA peut être clivé par des MetalloProtéinases (MMP) (Sun et al, 2014b; Yang et al, 2014). Ce clivage produit une forme soluble de MICA présente dans le sérum des patients. La fixation de MICA soluble sur NKG2D favorise l'internalisation du récepteur. Son action est donc inhibitrice de la réponse NK et par

conséquent délétère puisqu'elle engendre une diminution de la reconnaissance des cellules anormales ou tumorales par les cellules NK et les LT CD8<sup>+</sup> (Chitadze et al, 2013a).

### ***C. NKG2D et MICA dans la thérapie anti tumorale***

De nombreuses études ont mis en évidence que la signalisation induite par l'interaction entre NKG2D et son ligand MICA a un rôle important dans l'immunosurveillance tumorale. Les travaux de Guerra (Guerra et al, 2008) ont décrit, avec modèle transgénique d'adénocarcinome de prostate, que le développement tumoral est beaucoup plus important et agressif dans des souris déficientes en NKG2D. L'expression ectopique de MICA à la surface des cellules tumorales permettrait de faire pencher la balance de signaux en faveur de l'activation des cellules NK et d'induire un rejet des tumeurs *in vivo* (Cerwenka & Lanier, 2003; Diefenbach et al, 2001). Il a aussi été montré sur des lignées tumorales, dont le mélanome murin B16BL6, connu pour être peu immunogène et très agressif, que l'expression de RAE-1 augmente l'immunogénicité des tumeurs. En effet, ces cellules transfectées sont plus efficacement rejetées par des souris syngéniques et elles induisent une protection à long terme contre le développement tumoral après réinjection des souris avec les lignées tumorales parentales (Diefenbach et al, 2001). A l'inverse, les protéines RAE-1 solubles, en induisant une internalisation des récepteurs NKG2D, inhibent l'activité des cellules NK. Par conséquent, la détection de MICA soluble chez des patients atteints de cancers de différentes origines (Nausch & Cerwenka, 2008) pourrait être utilisée comme marqueur diagnostique clinique dans la progression tumorale (Holdenrieder et al, 2006). Une forte concentration de MICA soluble dans le sérum des patients serait alors corrélée à un mauvais pronostic.

L'ensemble de ces données suggère que le ciblage de NKG2D et de MICA pourrait constituer une nouvelle voie thérapeutique anti tumorale. Actuellement, différentes thérapies sont actuellement développées dans ce sens même si la majorité d'entre elles est encore au stade préclinique. Ces études évaluent notamment le transfert de LT chimériques exprimant NKG2D associé au CD3. Les protéines bispécifiques NKG2D/anti-CD3 qui se lient aux ligands de NKG2D sur les cellules tumorales et au CD3 sur les LT sont en cours d'étude. Enfin, le blocage du MICA soluble délétère par injection d'anticorps anti-MICA est aussi évalué (Spear et al, 2013).

Différentes approches ont été entreprises pour réaliser des immunothérapies anti cancer avec des cellules NK, car ces cellules lysent rapidement leur cellules cibles, ne sont pas CMH restreintes et leur rôle dans l'immunosurveillance des tumeurs a été démontrée. De plus, des niveaux élevés d'infiltrations tumorales par les cellules NK constituent des marqueurs pronostics favorables dans les cancers digestifs et pulmonaires.

Les premiers essais d'amplification des réponses NK pour favoriser le rejet tumoral ont été réalisés en administrant aux patients des cytokines telles que l'IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 et des IFNs, mais

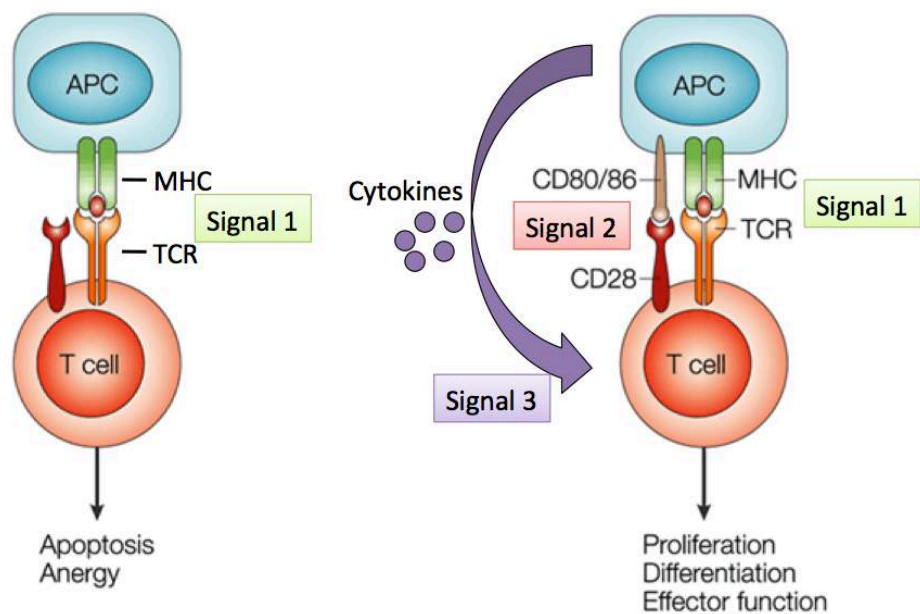
ces essais n'ont pas eu globalement d'impacts importants sur la survie des patients (Cheng et al, 2013). Des résultats décevants et surtout des effets secondaires graves, menaçant la survie des patients, ont été obtenus avec des protocoles associant des transferts adoptifs de cellules NK avec des doses élevées d'IL-2. Par contre les résultats étaient plus encourageants après transferts adoptifs de cellules NK activées *in vitro* avec de l'IL-2 (LAK). En particulier ces traitements induisent des réponses cliniques importantes dans le traitement des carcinomes rénaux, des glioblastomes et des cancers du sein. Pour améliorer encore les résultats en évitant l'inhibition de l'activité des NK induite par les CMH autologues, des transferts adoptifs ont été réalisés avec des cellules NK allogéniques dont l'activité n'est pas inhibée chez le receveur par les molécules du CMH-I autologues. D'autres transferts adoptifs ont utilisé des lignées stables allogéniques de cellules NK, ce qui facilitait les contrôles qualité et la production massive des cellules. Enfin d'autres approches ont aussi été réalisées avec des cellules NK fraîches ou des lignées de NK modifiées génétiquement pour produire de grandes quantités de cytokines anti tumorales ou pour surexprimer les récepteurs Fc, favorisant l'ADCC et/ou des récepteurs chimériques reconnaissant les antigènes de tumeurs. Malheureusement certains essais cliniques ont montré que la survie des cellules NK dans le sang périphérique des receveurs se limite à une semaine et surtout l'expression de leurs récepteurs activateurs, comme le NKG2D et par conséquent leur activité lytique anti tumorale sont fortement diminuées. Par contre la lignée NK-92 qui a été utilisée dans des essais cliniques n'a pas induit d'effets secondaires sévères chez les patients traités porteurs de mélanomes métastatiques ou de carcinomes rénaux. L'immunothérapie par transferts adoptifs de cellules NK est porteuse d'espoir mais nécessite encore d'importantes améliorations (Cheng et al, 2013).

## **V. Les lymphocytes T (LT)**

Les lymphocytes T sont les effecteurs majoritaires de l'élimination des cellules tumorales. Il existe différentes sous populations de LT : les LT CD4+, les LT CD8+, les LT régulateurs. Leurs différences reposent notamment sur l'expression de corécepteurs CD4 ou CD8, leur restriction CMH-I ou CMH-II et leurs fonctions (auxiliaires, effecteurs cytotoxiques ou régulateurs). Pour que ces LT puissent répondre de manière efficace divers signaux doivent être intégrés de manière successive.

### **1. Les LT CD4+**

Les LT CD4+ nécessitent au moins deux signaux pour leur activation. D'une part, la reconnaissance par leur TCR du couple CMH-II associé au peptide pour lequel le TCR est spécifique (Figure 17). Ce CMH-II est exprimé essentiellement sur les Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) telles que cellules dendritiques (CD) et les macrophages. Suite à la phagocytose de protéines exogènes provenant du milieu extracellulaire, les CPA dégradent ces protéines pour présenter les peptides antigéniques issus de ces protéines avec les CMH-II à leur surface afin de présenter efficacement ces peptides aux LT CD4+ (Rabenstein et al, 2014). D'autre part, un deuxième signal provenant des molécules de costimulation et un troisième induit par les cytokines sécrétées sont essentiels pour l'activation complète des LT CD4+ (nous y reviendrons plus en détail dans le Chapitre 2 – Partie VI et

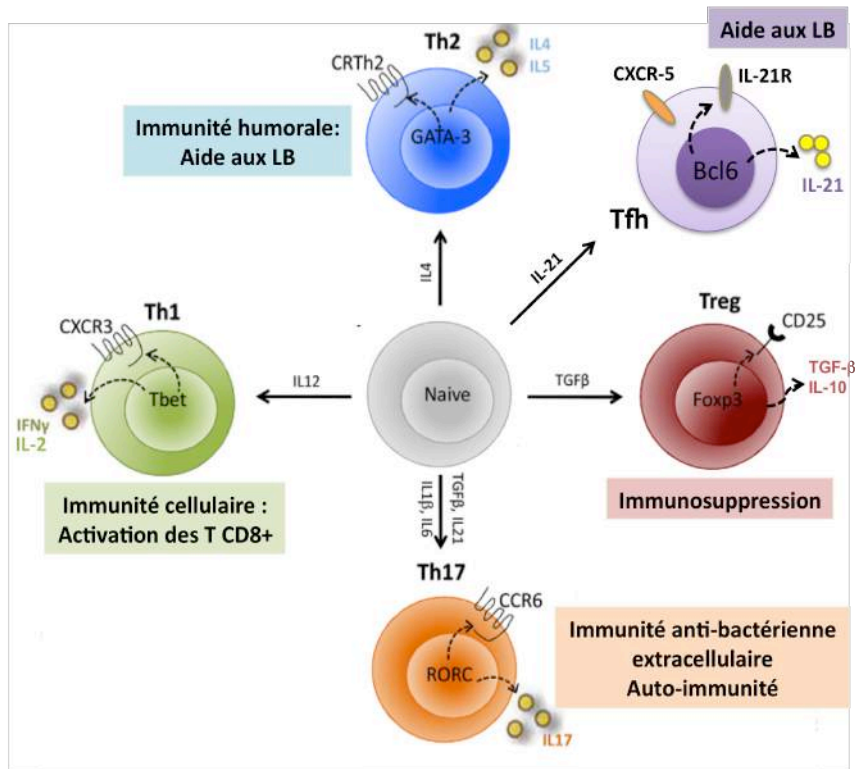


VIII (page 46 et 51)) (Figure 16).

**Figure 17 : Activation d'un lymphocyte T (adapté de (Alegre et al, 2001))**

L'interaction du complexe CMH/peptide seul avec le TCR spécifique induit l'anergie ou l'apoptose du lymphocyte T. La reconnaissance simultanée de ce complexe CMH/peptide par le TCR (Signal 1) suivie par la fixation des molécules de costimulation CD80/86 à leur récepteur CD28 (Signal 2 – costimulation) puis la sécrétion de cytokines aboutissent à l'activation complète du lymphocyte T (Signal 3). (CPA=APC : Antigen-presenting cell ; CMH=MHC : Major Histocompatibility Complex ; TCR : T Cell Receptor)

Les LT peuvent avoir différentes fonctions auxiliaires ou régulatrices. De plus, les LT CD4+ auxiliaires sont eux-mêmes divisés en quatre groupes en fonction de quatre caractéristiques : le type de cytokines qui induisent leur polarisation, les cytokines qu'ils sécrètent, les facteurs de transcription qu'ils expriment et leurs fonctions (Figure 18) (Geginat et al, 2013). Cette diversité est illustrée et résumée sur la figure 18.



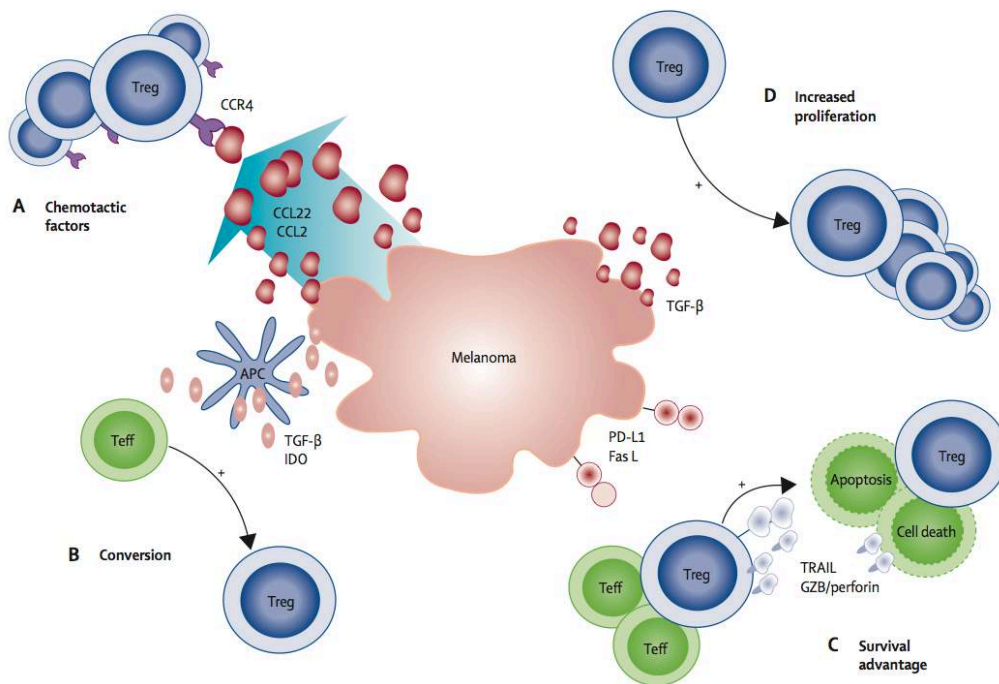
**Figure 18 : Polarisation des lymphocytes T CD4+ (adapté de (Geginat et al, 2013))**

- Les LT CD4+ de type **Th1** sont pro-inflammatoires, ils sécrètent principalement de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$ , de l'IL-2. Ils favorisent la différenciation des LT CD8+ en lymphocytes cytotoxiques (CTL). Dans les tumeurs, l'activité des cellules LT CD4+ Th1 est essentiellement anti tumorale car elles favorisent l'activité des cellules cytotoxiques anti tumorales (Szabo et al, 2000). L'IFN- $\gamma$  sécrété par les Th1 peut aussi participer à la production d'IgG2.
- Les LT CD4+ de type **Th2** sont anti-inflammatoires et sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. Ils permettent l'activation des LB et la sécrétion d'anticorps (Geginat et al, 2013; Zheng & Flavell, 1997). La production d'anticorps est accompagnée par une commutation de classe des immunoglobines différente selon la cytokine sécrétée par le LTh2, ainsi l'IL-4 est essentielle à la production d'IgE ou l'IL-10 pour les IgA (Nurieva & Chung, 2010).
- Les lymphocytes T CD4+ folliculaires (Tfh) expriment le récepteur de chémokine CXCR5 et migrent ainsi vers les follicules B des organes lymphoïdes secondaires, où ils soutiennent la différenciation et la maturation des lymphocytes B via la sécrétion d'IL-4 et d'IL-21 (Nurieva & Chung, 2010).
- Le sous-type **Th17** est induit par le TGF- $\beta$ , l'IL-6 ou l'IL-21, il sécrète de l'IL-17 (Awasthi & Kuchroo, 2009). Les LTh17 sont associés à des maladies auto-immunes. Le rôle joué par les lymphocytes Th17 dans le cancer est encore très controversé. La présence de Th17 augmenterait le recrutement de lymphocytes T CD4+ Th1 dans la tumeur et s'accompagnerait d'une diminution de la croissance tumorale (Nunez et al, 2012). Toutefois, dans un environnement cytokinique particulier, les



Th17 pourraient au contraire favoriser l'angiogénèse tumorale et par conséquent la croissance des tumeurs (Bruchard & Ghiringhelli, 2014).

- Les lymphocytes **T régulateurs** sont caractérisés par leur phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et l'expression du facteur de transcription FoxP3. Physiologiquement, ces lymphocytes ont une activité immunosuppressive contrôlée et participent au maintien de la tolérance immunologique au soi et à l'homéostasie immune (Ohkura & Sakaguchi, 2010). La population Treg présente un intérêt tout particulier dans les pathologies tumorales. En effet, depuis plusieurs années, leur rôle délétère dans le microenvironnement tumoral a été clairement identifié (Siri et al, 2012). Ils sont capables d'inhiber l'activité et la prolifération des LT CD8<sup>+</sup>, des LT CD4<sup>+</sup> et des cellules NK. Les Treg peuvent aussi induire l'apoptose de ces effecteurs *via* différents mécanismes : la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , mais aussi par leur expression constitutive de CTLA-4 ou de PD-L1 (Nishikawa & Sakaguchi, 2010). De ce fait, la présence des Treg dans les tumeurs, comme le cancer colorectal ou le mélanome, constitue un facteur de mauvais pronostic (Ladoire et al, 2011). C'est pourquoi l'inhibition des Treg est une voie thérapeutique actuellement en développement pour le traitement du mélanome (Jacobs et al, 2012) (Figure 19).

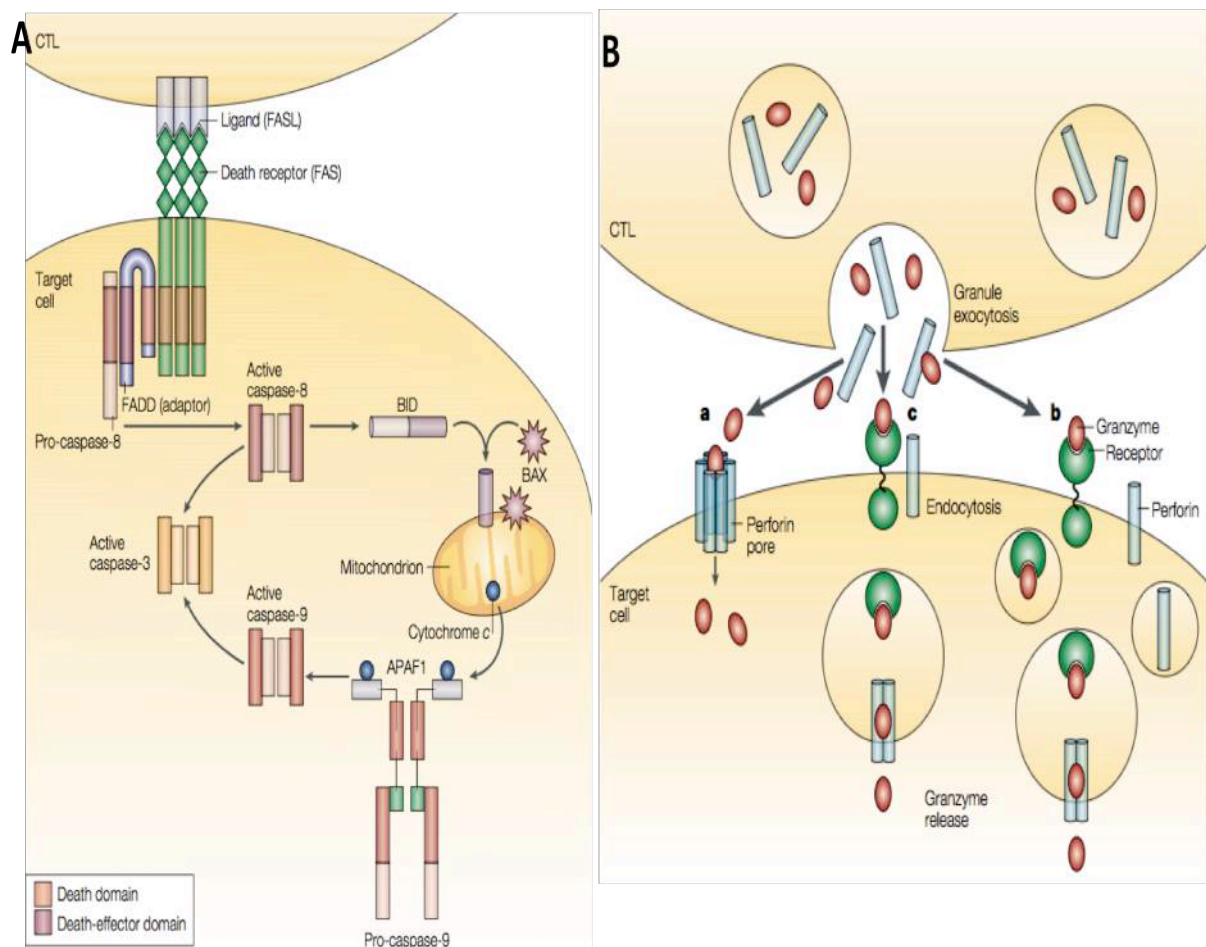


**Figure 19 : L'attraction et l'amplification des Treg par les cellules de mélanome** (Jacobs et al, 2012)  
 (A) Les LTreg sont attirés par les cellules de mélanomes. (B) Suite à l'action immunosuppressive des CPA (APC) les LT effecteurs peuvent être convertis en Treg. (C) Les Treg induisent l'apoptose des LT effecteurs. (D) Les Treg prolifèrent.



## 2. Les LT CD8+

L'activation des LT CD8+ nécessite trois signaux (Figure 17). Le premier signal est délivré suite à la reconnaissance du complexe CMH de classe I/peptide par le TCR. Si seul ce premier signal est présent, les LT entrent en anergie (latence) ou en mort par apoptose. Pour une activation complète et efficace, un deuxième signal délivré suite à l'interaction des molécules de costimulation avec leur ligand doit survenir dans les LT CD8+ (Smith-Garvin et al, 2009). Ce signal est indispensable à la différenciation, la survie et la prolifération des LT. Pour parfaire l'activation des LT, un troisième signal de prolifération est délivré par des cytokines sécrétées par les CPA (notamment l'IL-12 et l'IFN $\alpha/\beta$ ) pour instruire le lymphocyte vers une fonction cytotoxique (Curtsinger et al, 2007). Lorsque les LT CD8+ sont activés, ils se différencient en cytotoxique T lymphocytes (CTL) qui sont des effecteurs capables de lyser des cellules cibles comme des cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales (Smith-Garvin et al, 2009). Lorsque les CTL lysent leurs cellules cibles, ils expriment à leur membrane les marqueurs CD107a et CD69 et ils induisent la mort des cellules cibles par apoptose via plusieurs mécanismes : la sécrétion des perforines et des granzymes B ou l'expression de ligands des récepteurs de mort tels que Fas Ligand (FasL) et TRAIL (Barry & Bleackley, 2002) (Figure 20).

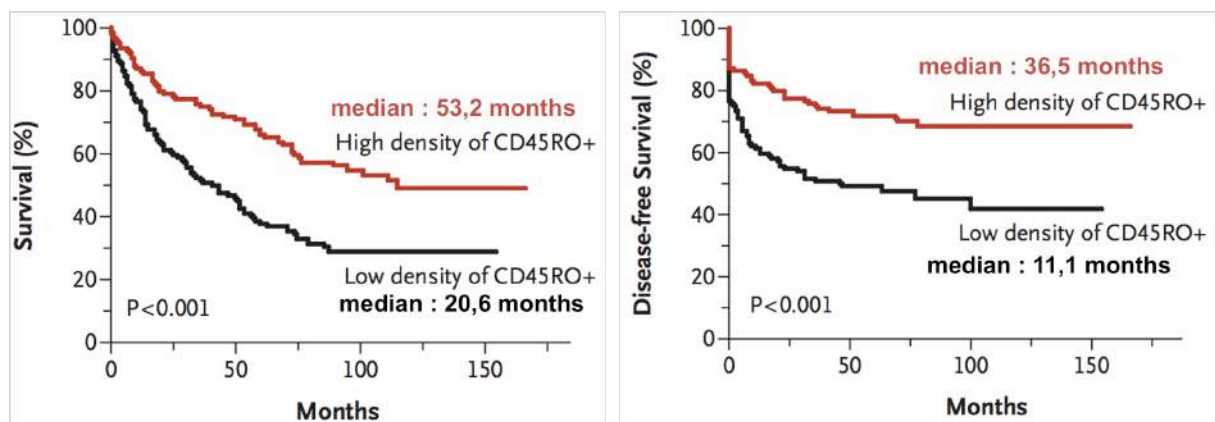


**Figure 20 : Cytotoxicité lymphocytaire médiée par la voie Fas/FasL ou la voie perforine/granzymeB (Barry & Bleackley, 2002)**

(A) Les CTL expriment FasL et trimérisent le récepteur Fas exprimé sur les cellules cibles ce qui aboutit au recrutement et à l'activation de la caspase-8 via les domaines de mort. Selon la quantité de caspase-8 activée, il y aura activation directe de la caspase-3 ou indirecte par intervention de la voie mitochondriale, pour finalement aboutir à l'apoptose de la cellule cible.

(B) Après interaction du CTL avec sa cellule cible, une exocytose dirigée des granules vers l'espace intercellulaire est mise en place. (a) Le modèle initial montrait que la perforine forme un pore dans la membrane cellulaire cible. Cela permet le passage des granzymes B dans le cytosol de la cellule cible qui vont ensuite activer la voie apoptotique caspase-dépendante. (b, c) Le deuxième modèle propose que Granzyme B soit internalisé par une endocytose médiée par un récepteur membranaire (le récepteur au mannose-6-phosphate). Ensuite, la perforine permet la libération des granzymes des endosomes vers le cytosol de la cellule cible.

Les lymphocytes T CD8+ et en particulier les CTL sont les effecteurs majeurs de l'immunité anti tumorale. Leur activité anti tumorale a clairement été identifiée depuis de nombreuses années et dans différents types de cancers. A l'heure actuelle, il est reconnu que l'activité cytotoxique des LT CD8+ dépendante de l'IFN- $\gamma$  est essentielle dans l'élimination des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Ikeda et al, 2002). Spontanément, les tumeurs sont infiltrées par des cellules immunes. La majorité des études montre que la présence de LT CD8+ est un facteur pronostic positif dans différents types de cancers (Fridman et al, 2012). En effet, une forte densité LT CD8+CD45RO+ (LT CD8 mémoires) est un facteur de bon pronostic en terme de survie globale (53 mois *versus* 20 mois pour une faible densité) et en terme de survie sans progression (36,5 mois *versus* 11,1 mois) chez des patients atteints de cancers colorectaux (Pages et al, 2005) (Figure 21).

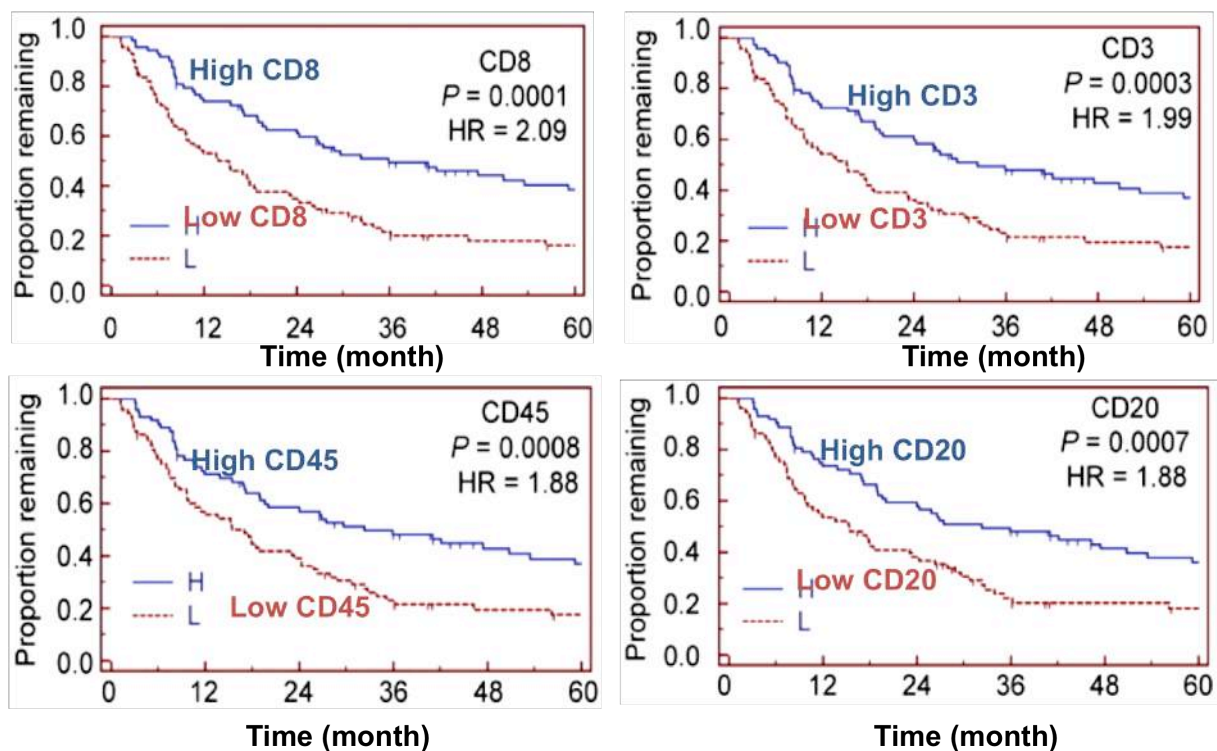


**Figure 21 : Corrélation entre la densité de lymphocytes T CD8+CD45RO+ (LT mémoires) et la survie des patients dans le cancer colorectal (adapté de (Pages et al, 2005))**

Les courbes de Kaplan-Meier suggèrent une survie globale et une survie sans progression rallongées chez les patients porteurs de tumeurs contenant une forte densité de lymphocytes TCD8+CD45RO+ en comparaison avec ceux contenant une faible densité.

Dans le mélanome, aussi la présence d'infiltration des tumeurs par des TIL est également un facteur de bon pronostic. En effet, la présence de TIL est un facteur prédictif de l'invasion des ganglions sentinelles. En cas d'infiltrat de TIL, seul 3% des ganglions sentinelles présentes des métastases contre 26% en absence de TIL (Taylor et al, 2007). De plus, dans une étude rétrospective réalisée sur des patients traités par vaccination autologue contre leur mélanome, il a été mis en évidence une infiltration significativement plus importante des tumeurs par des LT CD8+ et CD4+ chez les patients

répondeurs et ayant une survie globale beaucoup plus longue (56 mois *versus* 9,5mois) (Tjin et al, 2014). Les ratios TCD8+/TCD4+ sont également des facteurs pronostics de l'évolution des mélanomes car les Treg sont essentiellement des LT CD4+ alors que les LT CD8+ sont surtout anti tumoraux. Les ratios CD8+/CD4+, analysés dans le sang périphérique de patients atteints de mélanome, corrèlent avec le stade de la maladie. La diminution de ce ratio indique clairement un mauvais pronostic. De plus, ce ratio augmente chez les patients en stade avancé mais qui présentent une survie globale améliorée (Neagu et al, 2013). Enfin, les travaux de Erdag et ses collaborateurs ont montré que parmi les différentes populations immunes analysées, c'est la forte densité de LT CD8+ qui corrèle le mieux avec une meilleure survie générale des patients atteints de mélanomes métastatiques (Erdag et al, 2012) (Figure 22).



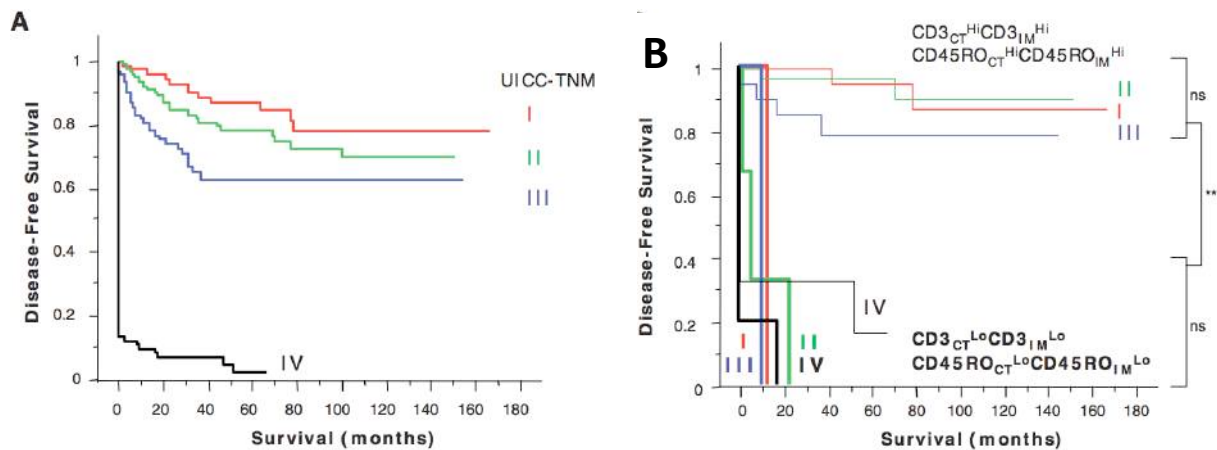
**Figure 22 : Corrélatin de la survie de patients atteints de mélanomes à la densité de cellules immunes infiltrants les tumeurs (adapté d' (Erdag et al, 2012))**

Les courbes de Kaplan-Meier suggèrent une survie globale plus longue pour les patients porteurs de mélanomes contenant de forts taux de cellules CD45+ immunes (marqueurs pan-cellules immunes), CD3+ (lymphocytes T), CD8+ (LT CD8+) et CD20+ (Lymphocytes B). Le marqueur CD8 semble être celui qui est associé aux plus longues survies dans cette étude (p-value=0,0001).

### **3. L'immunoscore : un facteur de bon pronostic du cancer colorectal**

Les travaux de l'équipe de Pagès ont permis de montrer qu'un important infiltrat intra tumoral de LT CD8+CD45RO+ est un facteur de bon pronostic dans le cancer colorectal. Ces travaux ont été poursuivis et la diversité des marqueurs de sous populations immunes étudiées au sein des tumeurs a été augmenté. Ces études, qui démontrent l'impact majeur de la qualité de l'infiltrat immunitaire intra tumoral sur l'évolution des cancers, suggèrent fortement une nouvelle prise en charge des patients. En

effet, depuis 2006 et sur un très grand nombre de patients, l'équipe du Pr. F. Pagès (Bindea et al, 2010; Galon et al, 2006; Galon et al, 2012b) a étudié de façon approfondie l'infiltration des cancers par les TIL, notamment dans le cancer colorectal (plus de 415 patients). Ils ont montré l'existence d'une forte corrélation entre le devenir des patients et le type d'infiltration des tumeurs par des lymphocytes, en particulier la nature, la localisation et la fréquence des TIL, essentiellement les LT CD8+ mémoires. Leurs travaux montrent que la présence de ces LT CD8+ mémoires au centre des tumeurs et dans les zones marginales constituent un véritable marqueur de bon pronostic. De plus, cette signature immunitaire semble être plus discriminante pour prédire la survie des patients que le système de classification TNM classique comme le montre la figure 23.



**Figure 23 : L'infiltrat de TIL a une valeur pronostique supérieure à celle fournie par la classification TNM dans le cancer colorectal (Galon et al, 2006)**

(A) Courbes de survie sans progression de patients atteints d'un cancer colorectal. Répartition en quatre stades (I=stade le plus précoce ; IV=stade le plus avancé)

(B) Courbes des mêmes patients dont la classification s'est faite en fonction de la densité et la localisation de lymphocytes T (CD3+) et mémoires (CD45RO+).

(Concentration Hi : forte, Lo : faible ; Localisation CT : centre de la tumeur, IM : zone marginale, périphérique)

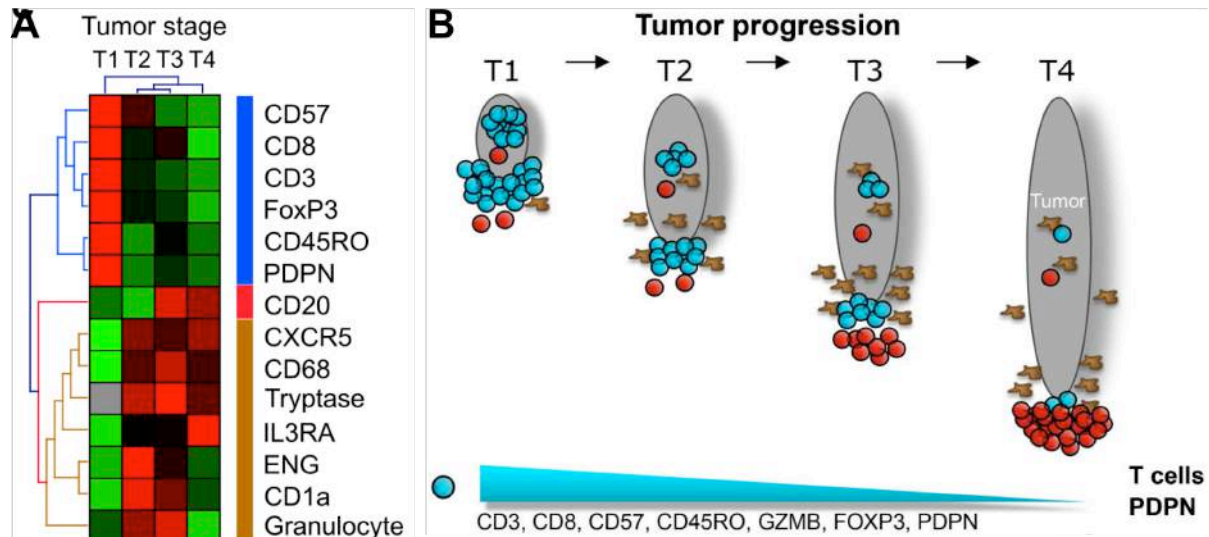
Ces figures comparent les survies des patients porteurs de cancers coliques en fonction du classement TNM (A) ou d'un classement TNM auquel est ajoutée une analyse des TIL CD3+CD45RO+ présents au centre des tumeurs (CT) ou en périphérie tumorale (IM) (B). Elles permettent de distinguer des sous-groupes de patients ayant des survies significativement diminuées quand ils présentent un faible infiltrat tumoral de LTCD3/CD45RO+.

Ainsi, le concept d'immunoscore a émergé ces dernières années. Il est basé sur la détermination de la densité intra tumorale de deux populations lymphocytaires (CD3+/CD45RO+ ou CD3+/CD8+ ou CD8+/CD45RO+) dans la tumeur et son front d'invasion (Galon et al, 2014). La valeur pronostique de ce critère immunitaire a été démontrée pour l'ensemble des patients présentant un cancer colorectal, à tous les stades de la classification histopathologique (TNM). Enfin, des analyses statistiques multivariées montrent que l'immunoscore est significativement plus discriminant que la classification TNM concernant la survie sans récurrence et la survie globale.

Par conséquent, l'intégration de l'immunoscore dans la classification des cancers pourrait se traduire par une amélioration de la précision du pronostic, mais aussi, potentiellement, de la prédiction de la réponse aux traitements. Une validation internationale de l'immunoscore est actuellement en cours de



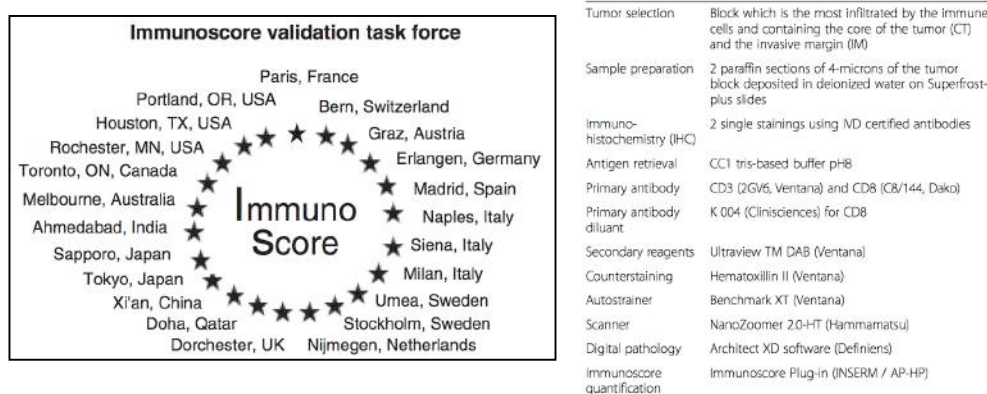
réalisation afin d'intégrer ce nouveau paramètre à la classification TNM des cancers et aboutir à une classification de type TNM-I (TNM-immune) (Galon et al, 2012a; Gandini et al, 2005) (Figure 24 et 25).



**Figure 24 : La densité et la localisation des différents types de populations cellulaires au cours de l'évolution du cancer colorectal (adapté de (Bindea et al, 2013))**

(A) La réaction immunitaire évolue en même temps que la progression tumorale du stade T1 au stade T4. On note que les marqueurs CD3, CD8 et CD45RO sont fortement exprimés au stade primaire de la maladie (T1) puis diminuent aux stades plus avancés. Dans cette illustration, les gènes fortement exprimés sont en rouge et les gènes faiblement exprimés sont en vert.

(B) La localisation des sous populations immunes varie au cours de la maladie : à un stade précoce (T1) ces cellules immunes infiltrent la tumeur, alors qu'à un stade plus avancé (T4) les cellules immunes ne se trouvent plus qu'en périphérie.



**Figure 25 : Validation internationale de l'immunoscore (adapté de (Galon et al, 2012a)) Centres d'étude sur le cancer participant à la validation internationale de l'immunoscore. (B) Procédures standards pour la mise en évidence de l'immunoscore.**

## VI. Les molécules de costimulation

Suite à l'engagement du TCR après interaction avec son complexe CMH/peptide spécifique, l'activation des LT nécessite un deuxième signal d'activation qui passe par les molécules de costimulation. Elles se divisent en deux grandes familles selon leur homologie structurelle : la superfamille des Immunoglobulines (Ig) et la superfamille du Tumor Necrosis Factor (TNF).

### 1. La costimulation par le récepteur CD28 et ses ligands activateurs CD80/CD86

Les couples CD28 – CD80/CD86 sont les plus étudiés dans la superfamille des Ig. Les autres ligands de cette superfamille sont représentés sur la figure 26 (Wang & Chen, 2004). Le récepteur CD28 est exprimé sur les LT et ses ligands sur les APC. La signalisation induite par le récepteur CD28 est essentielle dans les phases d'initiation de l'activation des LT. Suite à la liaison de CD80 ou de CD86 sur CD28, les LT sont activés, leur survie est augmentée ainsi que leur sécrétion des cytokines, *via* une augmentation de leur transcription (Linsley et al, 1991) et de la stabilité de leur ARNm (Lindstein et al, 1989). Les protéines CD80 et CD86 sont aussi appelées B7-1 et B7-2. Certaines cellules de tumeurs solides expriment faiblement CD80/CD86 ce qui favorise les réponses immunes anti tumorales. Notre équipe a précédemment montré que le traitement avec des statines ou un inhibiteur de la géranyl-géranyl-transférase sur des cellules de mélanome murin ou humain induit une surexpression membranaire de CD80 et CD86. Cette surexpression favorise leur rejet immun (Sarrabayrouse et al, 2010; Tilkin-Mariame et al, 2005).

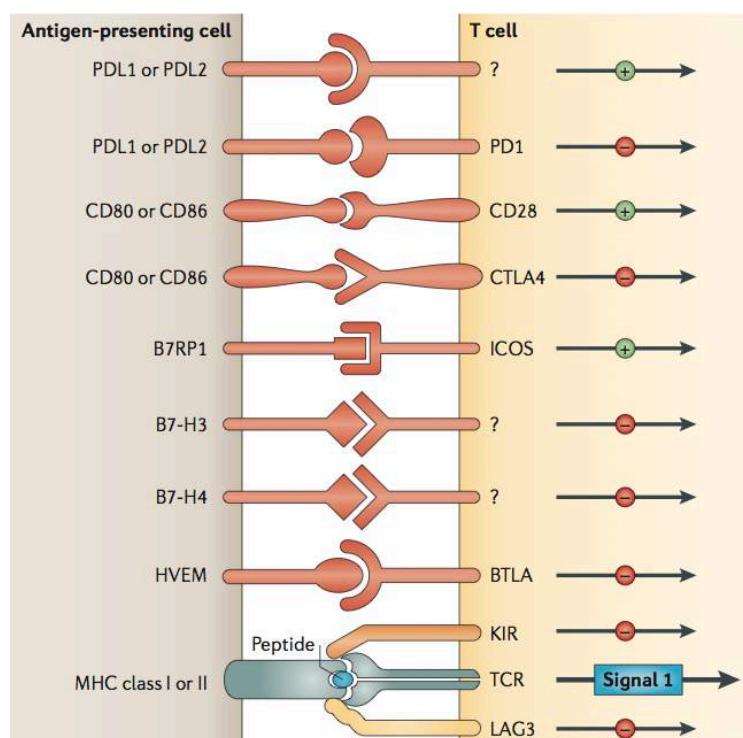
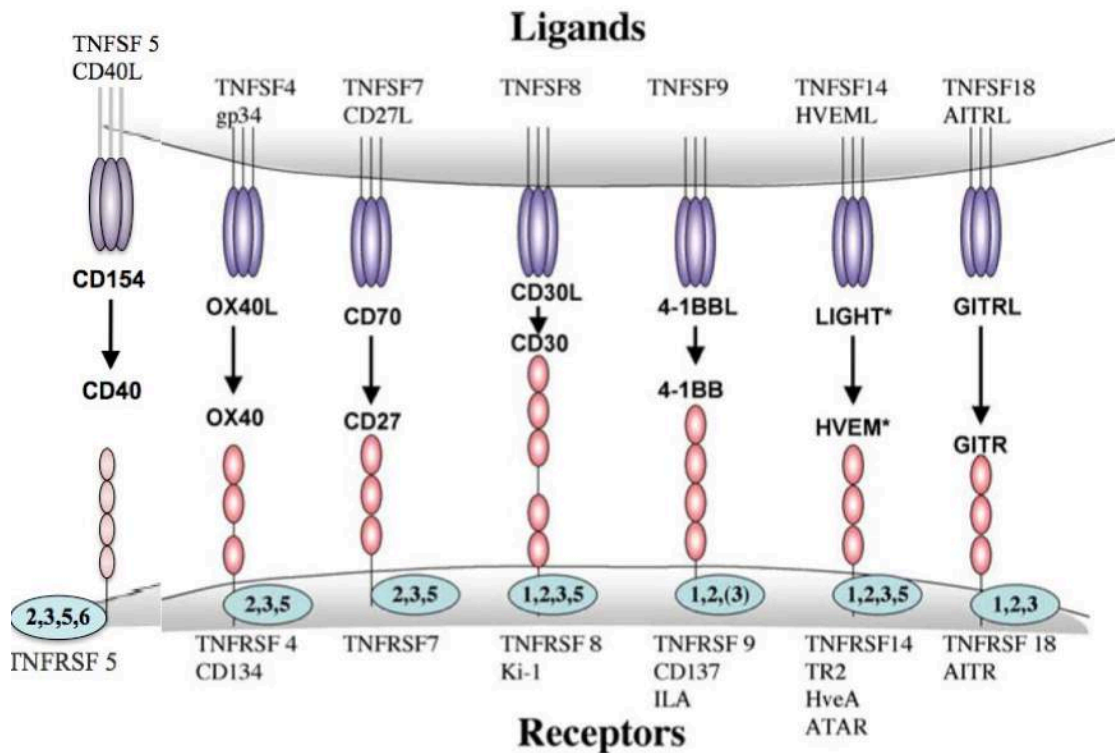


Figure 26 : Les couples ligand/récepteur de la superfamille des Ig et leurs fonctions costimulatrices ou co-inhibitrices sur l'activité des LT (adapté de (Pardoll, 2012))

## 2. La costimulation par le récepteur CD27 et son ligand CD70

Parmi les molécules de costimulation appartenant à la superfamille du TNF receptor (TNFR), on retrouve les couples récepteurs/ligands suivants : CD40/CD40L, 4-1BB/4-1BBL, CD30/CD30L, OX40/OX40L, HVEM/LIGHT, GITR/GITRL et CD27/CD70 (Kober et al, 2008; Watts, 2005) (Figure 27).



**Figure 27 : les couples ligand/récepteur de costimulation de la superfamille des TNFR/TNF (d'après (Watts, 2005))**

Le couple CD27-CD70 a été particulièrement étudié dans les lymphocytes (Denoeud & Moser, 2011; Nolte et al, 2009) mais aussi dans quelques tumeurs solides comme les glioblastomes (Chahlavi et al, 2005; Wischhusen et al, 2002) et les carcinomes rénaux (Diegmann et al, 2006; Jilaveanu et al, 2012).

Le récepteur CD27 est une glycoprotéine de type I présente à la membrane des LT sous forme dimérique. CD27 est exprimé sur les thymocytes précoces, les LT CD4+ et CD8+ naïfs, les cellules NK activées et les LT de la mémoire centrale. Il est surexprimé lors de l'activation des lymphocytes puis son expression diminue au cours de l'expansion et de la différenciation des effecteurs immuns (Denoeud & Moser, 2011). CD27 se trimérise lors de la fixation de son ligand CD70. Le domaine intracellulaire de CD27 est dépourvu de domaine de mort mais deux types de protéines y sont recrutées : les protéines adaptatrices TRAF et les protéines pro-apoptotiques SIVA. TRAF2 et TRAF5 (TNFR-associated factor 2 et 5) permettent le recrutement et l'activation de NF- $\kappa$ B Inducing Kinase (NIK) et ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B. TRAF2 active aussi Jun N-terminal Kinase (JNK) via la voie des MAPK (Akiba et al, 1998). Ces deux voies métaboliques induisent des signaux anti-apoptotiques de

survie cellulaire (Yamamoto et al, 1998). Toutefois, CD27 peut au contraire induire une voie alternative d'apoptose en générant des signaux de mort via les protéines pro-apoptotiques SIVA1 et SIVA2 (Diegmann et al, 2006; Prasad et al, 1997) (Figure 28). L'interaction entre CD70 et CD27 entraîne dans des conditions physiologiques la prolifération et la survie des LT, notamment au niveau du site de stimulation primaire et augmente leurs fonctions effectrices (Borst et al, 2005). La signalisation CD27/CD70 favorise aussi la réponse TCD8 mémoire après immunisation (Arens et al, 2004). Dans les LB, l'activation de CD27 induit leur transformation en plasmocytes et la production d'anticorps.

CD70 (CD27L) est une protéine transmembranaire de type II qui est active sous forme homotrimérique membranaire. Sur les lymphocytes, son expression est restreinte et dépend de l'état d'activation des cellules. Elle est exprimée de façon transitoire sur les LT, LB et les CD suite à une stimulation par un récepteur antigénique ou un TLR (Croft, 2009; Polak et al, 2012). Elle peut aussi être surexprimée en réponse à IL-1 $\alpha$ , IL-12, GM-CSF ou TNF- $\alpha$ , ou au contraire réprimée par l'IL-4 ou l'IL-10 (Nolte et al, 2009).

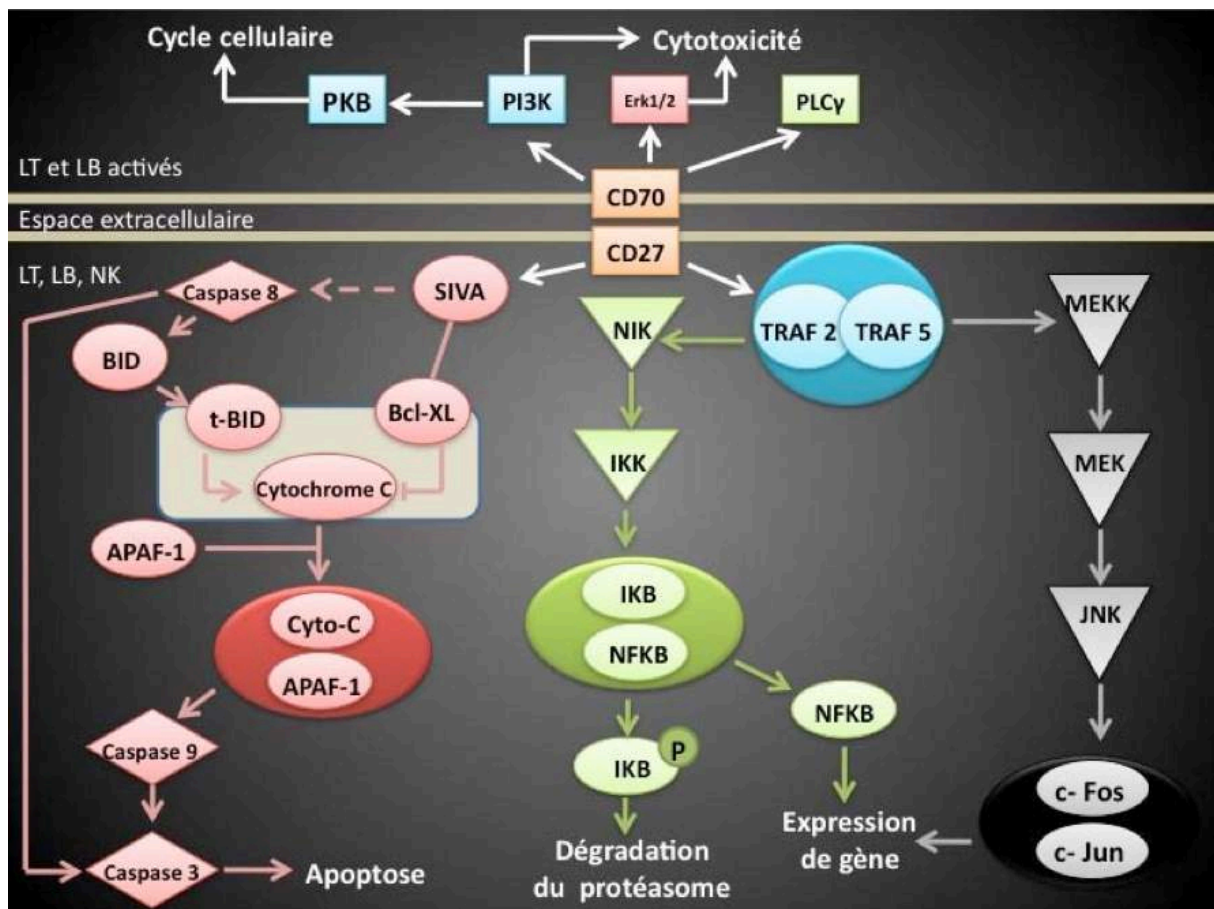


Figure 28 : Les cascades de signalisation induites par la liaison entre CD27 et CD70 (d'après (Diegmann et al, 2006; Garcia et al, 2004; Prasad et al, 1997; Yamamoto et al, 1998))



L'équipe du Pr. L. Lopez-Botet (Garcia et al, 2004) a montré qu'il existait des signalisations intracellulaires *via* CD70 dans des cellules lymphocytaires. Ces signalisations induisent l'activation de la voie des MAPK et de la PI3K qui favorisent la cytotoxicité lymphocytaire et l'activation du cycle cellulaire (Figure 28).

Néanmoins, dans des conditions non physiologiques, l'interaction CD27/CD70 peut conduire à des dysfonctionnements des LT. En effet, chez des souris transgéniques, l'expression de CD70 constitutive sur les cellules immunes aboutit à une déplétion progressive des LT naïfs dans les organes lymphoïdes conduisant à l'épuisement des stocks de LT et à une mort suite à des infections opportunistes (Nolte et al, 2009).

De façon inattendue, CD70 a été retrouvé à la surface de plusieurs tumeurs dont quelques tumeurs solides telles que les glioblastomes, les carcinomes thymiques, rénaux et ovariens mais aussi les leucémies lymphoïdes chroniques et des lymphomes non Hodgkiniens (Aulwurm et al, 2006; Diegmann et al, 2006; Glouchkova et al, 2009; Liu et al, 2013).

Des expériences réalisées essentiellement sur des modèles tumoraux murins montrent que la signalisation CD27/CD70 améliorerait l'immunité anti tumorale. L'administration d'un anticorps agoniste de CD27 s'est montrée protectrice contre le développement de deux lignées de lymphomes et du mélanome murin B16F10 (French et al, 2007; Roberts et al, 2010). De plus, notre équipe a précédemment montré que l'expression tumorale de CD70 ou la coexpression de CD40L (une autre molécule de costimulation de la superfamille du TNF) et de CD70 avec une molécule de CMH-I allogénique (H-2Kd) induit dans les cellules de mélanome murin B16F10 une forte immunité protectrice anti tumorale (Cormary et al, 2004; Cormary et al, 2005).

Toutefois, d'autres études ont montré que l'interaction CD27/CD70 peut être délétère dans le microenvironnement tumoral. En effet, dans des souris déficientes en CD27, le développement de différentes tumeurs est ralenti. Cela s'expliquerait par l'augmentation dans les souris contrôles de la proportion de LTreg intratumoraux qui est favorisée par l'engagement de CD27 (Claus et al, 2012). De plus, des lymphomes B non-Hodgkiniens humains exprimant CD70 induiraient l'expression de Foxp3 dans les LTreg intratumoraux générant un fort contexte immunosuppresseur. Enfin, l'expression de CD70 sur des glioblastomes constitue aussi une voie d'échappement tumoral au système immunitaire (Wischhusen et al, 2002).

## **VII. Les molécules de corépression**

Comme il existe des voies d'activation des LT, il existe également des points de contrôle immuns qui limitent leur action (Pardoll, 2012). Ces points de contrôle (aussi appelés « immune checkpoints ») correspondent aux divers mécanismes immuns nécessaires au maintien de la tolérance du soi, à limiter l'auto-immunité, à moduler la durée et l'amplitude des réponses immunes physiologiques. Parmi ces mécanismes, on connaît divers couples récepteur/ligand dont la fixation a une activité inhibitrice de la

fonction des LT : CTLA-4/CD80/CD86, PD-1/PD-L1, B7-H4, BTLA /HVEM ou encore TIM3/GAL9. Nous allons décrire plus en détail sur les couples CTLA-4/CD80/CD86 et PD-1/PD-L1, car ils sont les plus étudiés et sont la cible d'immunothérapies du mélanome (Chapitre I, Partie III-6-D, page 20).

### 1. La corépression par le récepteur CTLA-4 et ses ligands CD80/CD86 :

Le récepteur Cytotoxique T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4/CD152) partage les mêmes ligands que CD28 mais possède des fonctions inhibitrices. Il est très étudié car il est la cible privilégiée des traitements cliniques exploratoires d'immunothérapie contre le mélanome. Contrairement à CD28 qui est exprimé constitutivement sur les LT naïfs et activés, CTLA-4 est uniquement exprimée à la membrane des LT à la suite de l'engagement du TCR. En effet, l'activation du TCR réorganise le réseau de microtubules et recrute CTLA-4 initialement stocké dans des compartiments intracellulaires. CTLA-4 possède une affinité beaucoup plus importante que CD28 pour CD80. L'expression de surface de CTLA-4 peut donc déplacer les molécules de CD80 et de ce fait empêcher leur liaison sur CD28. La liaison CTLA-4 – CD80/CD86 déclenche des signaux régulateurs négatifs de l'activation des LT. En effet, CTLA-4 inhibe la signalisation induite par CD28 comme l'activation de la transcription et de la sécrétion d'IL-2. Sur les CPA, la liaison CTLA-4/CD80/CD86 induit le relargage d'inhibiteurs des LT comme IDO (Indoléamine 2,3-DiOxygénase) (Rudd, 2008) (Figure 29). De plus, CTLA-4 est un gène cible de facteur de transcription Foxp3 ce qui explique sa forte expression sur les Treg (Walker, 2013). L'activation de CTLA-4 active la prolifération et les fonctions immunomodulatrices des Treg comme la sécrétion des cytokines immunosuppressives TGF- $\beta$  et IL-10. Ainsi, le ciblage CTLA-4 avec un anticorps bloquant régule négativement l'activité des Treg. Par conséquent, l'activation des CTL et la maturation des CD sont augmentées ce qui favorise la réponse immunitaire anti tumorale.

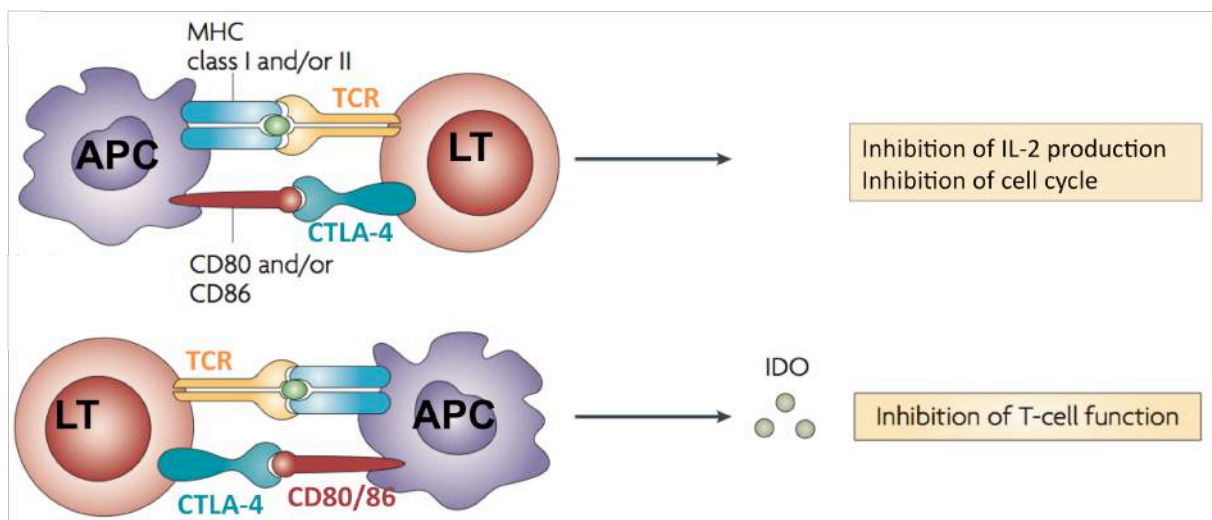
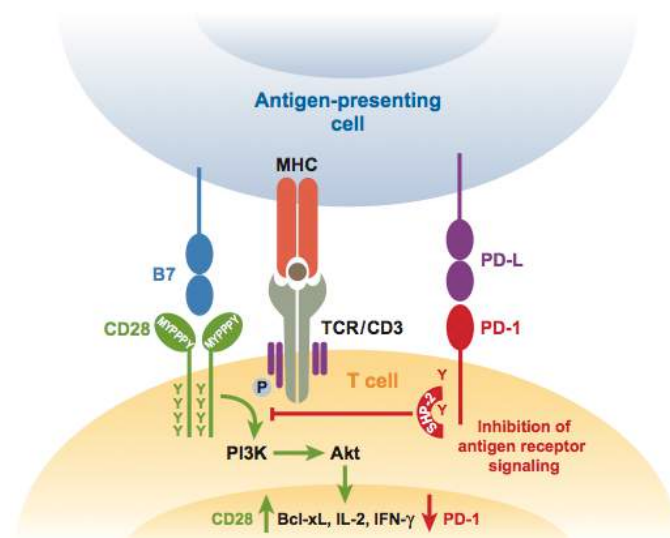


Figure 29 : L'inhibition de la réponse immunitaire par CTLA-4 (d'après (Rudd, 2008))

## 2. La corépression par le récepteur PD-1 et son ligand PD-L1 :

Une autre molécule très étudiée de cette superfamille des Ig est Programmed cell Death-1 (PD-1/CD279). PD-1 est également un récepteur induisant une co-signalisation négative. Il se fixe aux molécules PD-1 Ligand (PD-L1/B7-H1/CD274) et PD-L2 (B7-DC/CD273) (Nurieva et al, 2009). PD-1 est exprimé sur les LT, les LB, les cellules NKT activés ainsi que sur les monocytes et les CD activés. Son ligand PD-L1 est exprimé à la surface des LT et LB activés, des monocytes, des CD et des cellules endothéliales. L'interaction PD-1/PD-L1 empêche l'activation de la PhosphoInositide 3 Kinase (PI3K) qui est induite suite à l'interaction de CD28 avec ses ligands activateurs CD80/CD86 (Keir et al, 2008) (Figure 30). Cette voie inhibitrice est très étudiée et porteuse d'espoir dans les traitements des maladies auto-immunes. De plus, PD-L1 est exprimé à la membrane de nombreuses tumeurs telles que des carcinomes pulmonaires, des cancers rénaux ou encore des mélanomes. Dans ces tumeurs, PD-L1 est associé à un échappement tumoral et serait donc de mauvais pronostic (Choueiri et al, 2014; Gettinger & Herbst, 2014; Mamalis et al, 2014).



**Figure 30 : L'inhibition de l'activation des LT par PD-1/PD-L1, via l'inhibition de la PI3K** (Keir et al, 2008)

*La fixation de PD-L1 sur PD-1 conduit au recrutement de la phosphatase SHP-2 qui déphosphoryle et inhibe la voie PI3K/Akt normalement activée par CD28. Ceci va finalement abolir l'activation des LT, qui inhibe la production de cytokines (IFN- $\gamma$ ), la prolifération et la survie cellulaire.*

## VIII. Le troisième signal d'activation

Un troisième signal d'activation est nécessaire pour la prolifération des LT (Dranoff, 2004). Cette terminologie a récemment été définie et décrit les cytokines sécrétées par les CPA. Elles permettent ainsi d'instruire les lymphocytes vers un type d'effecteurs : Th1, Th2 ou CTL (Reis e Sousa, 2006). Ce troisième signal est généralement induit par de l'IL-12 qui promeut le développement des LT Th1 et des CTL, ou par l'IL-4 ou le ligand Notch qui promeuvent les LT de type Th2.

## IX. Immunoédition

Il est donc admis que le système immunitaire (SI) prévient l'établissement de conditions inflammatoires propices au développement tumoral et possède une activité anti tumorale par l'intermédiaire de ses nombreux effecteurs. Néanmoins, les interactions entre tumeurs et SI sont plus complexes. En 2002, Dunn et collaborateurs montrent que le SI peut à la fois contrôler la progression tumorale mais aussi limiter l'immunogénicité des cellules tumorales (Dunn et al, 2002). Cela a conduit à l'émergence du concept d'immunoédition. Ce nouveau concept correspond à l'ensemble des événements qui surviennent lors du développement tumoral (Schreiber et al, 2011). En effet, par son action le SI élimine des cellules tumorales. Néanmoins, il sélectionne des cellules tumorales devenues insensibles aux réponses immunes. Celles-ci influencent à leur tour le microenvironnement tumoral pour favoriser leur croissance. Un environnement immunosuppresseur se met alors en place pour inhiber l'élimination de la tumeur par le SI. Ainsi l'immunoédition des tumeurs est composé de trois étapes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Schreiber et al, 2011) (Figure 31).

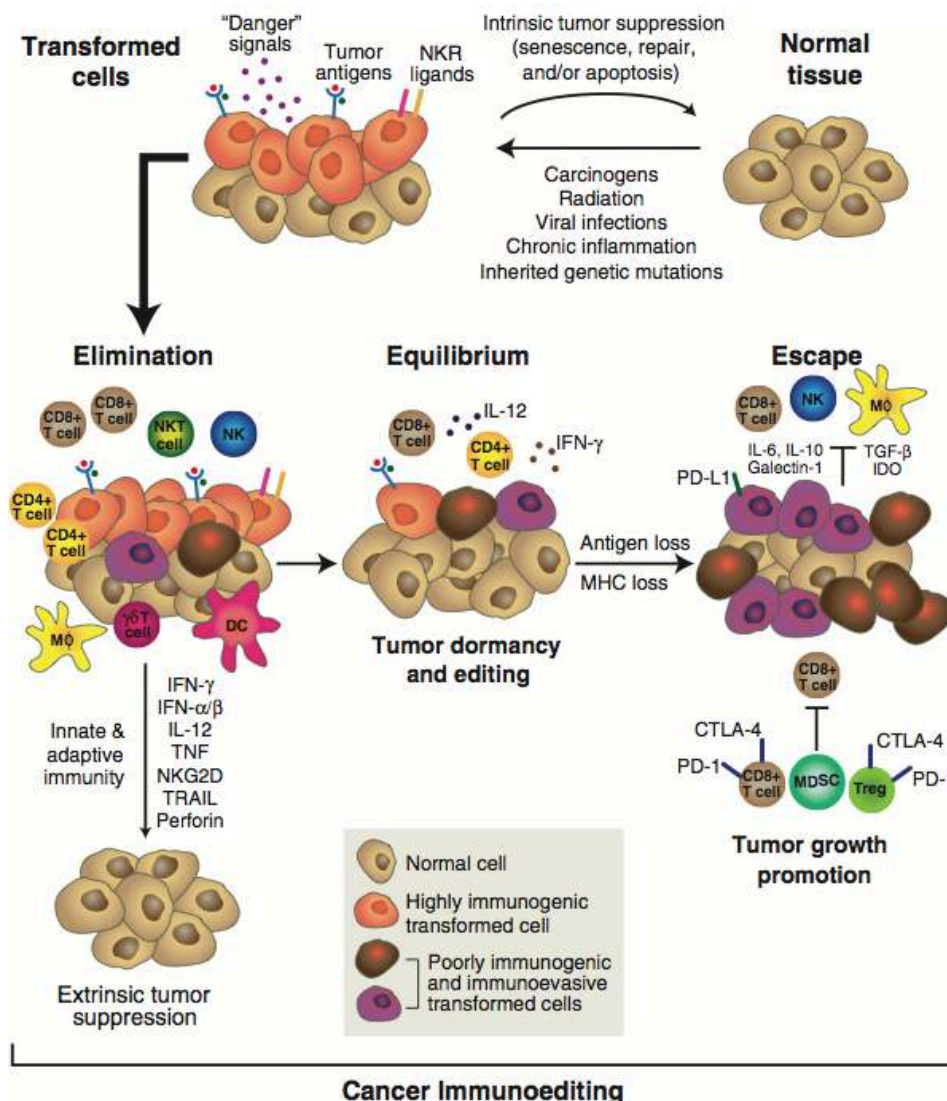


Figure 31 : L'immunoédition des cellules tumorales (Schreiber et al, 2011)

### **1. L'élimination**

Lors de la phase d'élimination, le dialogue entre l'immunité innée et l'immunité adaptative permet la détection des tumeurs et aboutit à la lyse des cellules tumorales. Les signaux de danger nécessaires et reconnus par le SI peuvent être des cytokines, tels que l'IFN- $\gamma$  (Street et al, 2002), des ligands de stress, tels que MICA et RAE-1 (Oppenheim et al, 2005) ou encore des antigènes de tumeurs. Cette élimination se fait principalement par la voie perforine/granzyme ou la voie apoptotique Fas/FasL (Chavez-Galan et al, 2009). Si l'élimination des cellules tumorales est complète, l'immunoédition s'arrête à cette première étape avec la disparition de la totalité des cellules tumorales.

### **2. L'équilibre**

Au cours de cette deuxième phase, les cellules tumorales qui ont échappé à l'élimination se retrouvent en dormance. Le SI inflige une pression de sélection qui contrôle et empêche le développement des cellules tumorales sans les éliminer (Koebel et al, 2007). Cette sélection modifie l'immunogénicité des cellules tumorales et favorise l'apparition des mécanismes d'échappement, ce qui aboutit finalement à la réémergence de tumeurs primaires ou de métastases à distance des mois, parfois des années, après la première détection du cancer (Aguirre-Ghiso, 2007).

### **3. L'échappement**

La troisième et dernière phase d'échappement est caractérisée par l'échec du SI à contrôler les cellules tumorales persistantes. Des clones tumoraux résistants se développent car ils sont devenus moins immunogènes suite à une édition par le SI ou à cause de l'environnement immunitaire devenu moins anti tumoral (Mittal et al, 2014). Le SI peut devenir moins anti tumoral suite à une immunosuppression ou une détérioration comme c'est le cas chez des patients après transplantations ou chez les patients atteints de SIDA. L'édition des cellules tumorales peut modifier les caractéristiques intrinsèques de ces cellules en diminuant la reconnaissance par le SI ou en augmentant leur résistance à la mort.

Les stratégies d'échappement immunitaire anti tumorale sont variées et peuvent être classées en deux grandes catégories : d'une part, des modifications intrinsèques de la cellule tumorale qui nécessitent un contact cellulaire avec la tumeur et d'autre part, des modifications extrinsèques correspondant à l'action de facteurs sécrétés qui inhibent directement ou indirectement les cellules immunes environnantes (Vesely et al, 2011) (Figure 32).

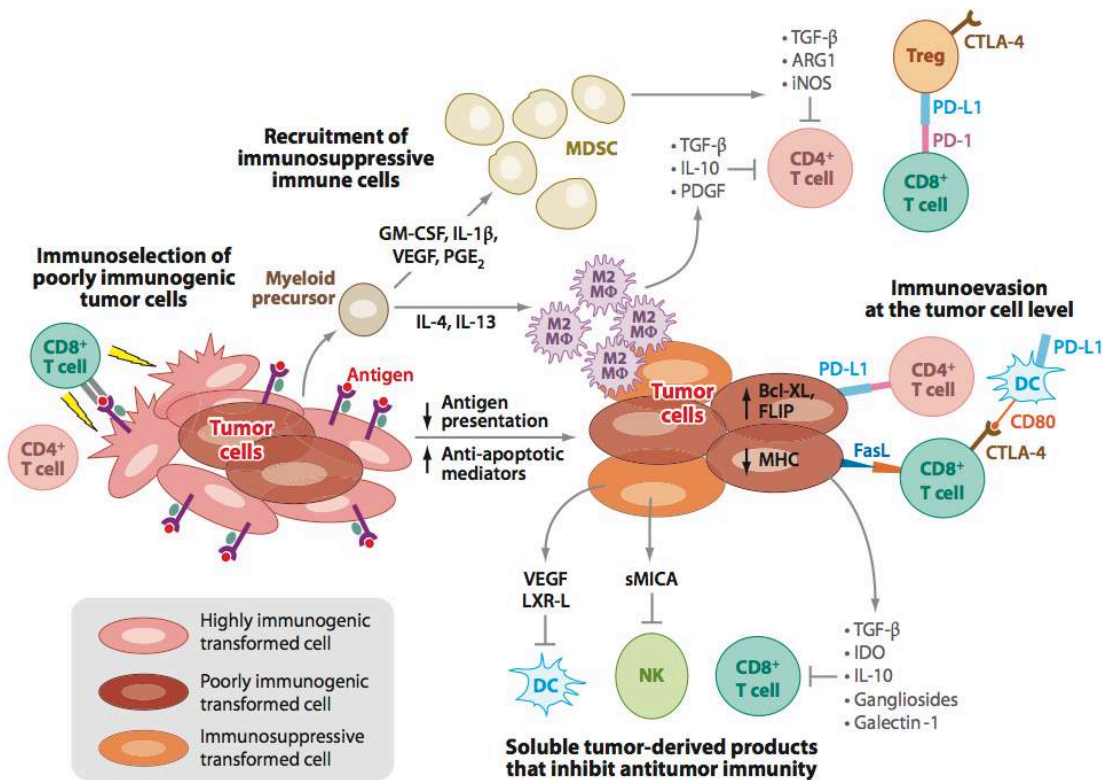


Figure 32 : L'ensemble des mécanismes d'échappement tumoral et des effecteurs immuns impliqués (Vesely et al, 2011)

## A. Les modifications intrinsèques de la tumeur

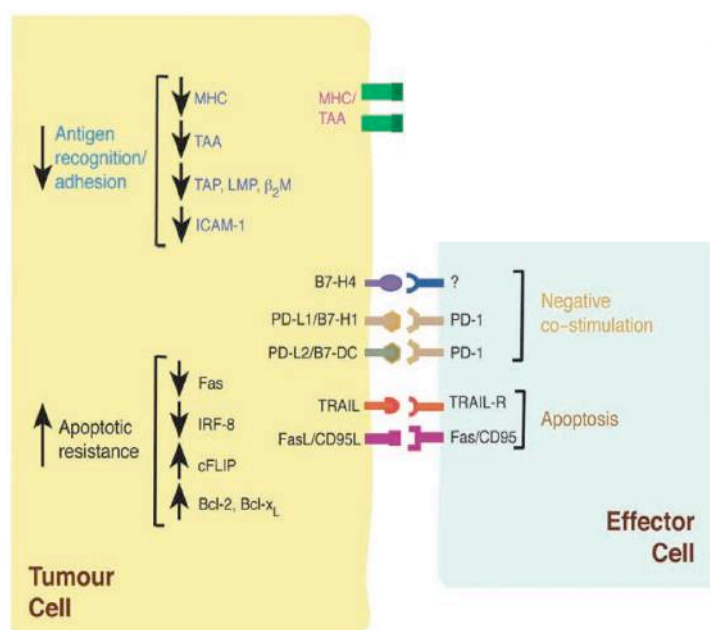
### a. Modification de la reconnaissance antigénique

Comme précédemment décrit, la présentation antigénique par les CMH-I est essentielle à la reconnaissance par les LT. Des altérations de cette présentation CMH-I/peptide, notamment au niveau de la voie d'apprêtement du peptide présenté sur le CMH-I, ont été fréquemment rapportées dans de nombreuses tumeurs dont le mélanome (Garrido et al, 2010; Garrido et al, 2012; Leone et al, 2013) (Figure 33). En effet, la dérégulation de l'expression du CMH-I semble être un phénomène assez courant. Elle s'explique soit par la perte de la  $\beta$ 2-microglobuline (qui entraîne un défaut d'assemblage du CMH-I) soit par une dérégulation des protéines TAP1/TAP2 (nécessaires au chargement des peptides antigéniques sur le CMH-I dans le réticulum endoplasmique) (del Campo et al, 2014; Sucker et al, 2014). Enfin, des pertes d'expression des antigènes tumoraux (TAA) sont également décrites. Ainsi, dans le mélanome, la dérégulation des TAA MelanA/MART-1 ou TRP-2 favorisent le développement tumoral (Guo et al, 2014; Khong et al, 2004). Pour diminuer la reconnaissance des cellules tumorales par les effecteurs du SI, certaines tumeurs dérégulent l'expression membranaire d'antigènes de rejet tels que les ligands de NKG2D (Fuertes et al, 2008)



### b. Résistance à l'apoptose

En terme d'événements moléculaires survenant dans l'oncogénèse, la résistance à l'apoptose est maintenant considérée comme un marqueur lié à la progression tumorale (Hanahan & Weinberg, 2011). Ce phénomène est bien décrit dans le mélanome (Ivanov et al, 2003). Cette résistance trouve son origine dans différents événements moléculaires comme la perte d'expression ou de fonctionnalité du récepteur apoptotique Fas suite à des mutations génétiques (Tauzin et al, 2011) (Figure 33). Une dérégulation d'un autre récepteur de mort qui se lie au ligand, TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) est aussi retrouvée dans les mélanomes (Berger et al, 2014). Différents défauts dans les étapes de la cascade de signalisation apoptotique ont également été mises en évidence telles que : des mutations de la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) ou de la pro-caspase 8 (Stewart & Abrams, 2008), mais aussi la surexpression de c-FLIP (FLICE inhibitory protein) qui est associé à la résistance à l'apoptose (Tian et al, 2012). Enfin, comme le ratio entre les membres pro- et anti- apoptotiques de la famille Bcl-2 influence la sensibilité à l'apoptose, la surexpression de Bcl-2 et Bcl-xL, qui sont anti apoptotiques, est fréquemment retrouvée dans les tumeurs (Figure 33) (Anvekar et al, 2011).



*Figure 33 : Mécanismes d'échappement intrinsèques dépendant du contact cellulaire (adapté de (Stewart & Abrams, 2008))*

### c. Absence de costimulation ou costimulation inhibitrice

L'expression faible ou inexistante des molécules de costimulation activatrices comme CD80 et CD86 participe au faible niveau d'activation des LT anti tumoraux par la présentation antigénique directe par les cellules tumorales dans le microenvironnement tumoral. Cette faible expression des molécules CD80 et CD86 sur les cellules tumorales favorise l'anergie des LT CD8+ spécifiques présents dans ce microenvironnement tumoral. Ceci a été confirmé expérimentalement en inversant la situation par

réintroduction de molécules de costimulation CD80 et CD86 exprimées sur les cellules tumorales. En effet, si lors d'expériences *in vitro* on introduit des molécules CD80 et de l'IL-2 dans des cellules de mélanome, elles induisent une activation des LT CD8<sup>+</sup> et une sécrétion d'IFN- $\alpha$  plus importante (Mazzocchi et al., 2001). Cette faible expression tumorale de CD80/CD86 est toutefois compensée par l'activation des CD lors de la cross-présentation.

Des mécanismes entraînant l'anergie et même la délétion de LT spécifiques de tumeur ont aussi été décrits. Par exemple, certaines cellules tumorales expriment la molécule B7-H1/PD-L1 qui interagit avec le récepteur PD-1 des LT activés ce qui induit l'anergie de ces LT (Hino et al, 2010) (Figure 33). Récemment, un nouveau membre de la famille de B7, B7-H4 a été identifié dans plusieurs types de cancers comme le cancer du sein, du poumon ou du pancréas (Awadallah et al, 2008; Sun et al, 2006b; Tringler et al, 2005). Il a été montré que cette molécule est capable d'inhiber le cycle cellulaire et la cytotoxicité des LT (Seliger, 2014).

#### **d. L'induction de l'apoptose des effecteurs immuns par la voie Fas/FasL**

L'expression ectopique du ligand d'apoptose FasL sur les cellules tumorales constitue un autre mécanisme d'échappement tumoral.

##### **i. Description**

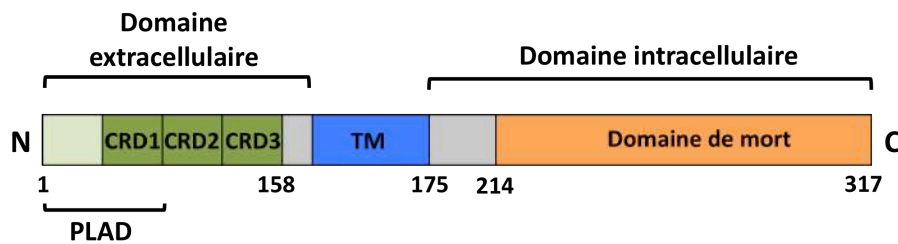
Le récepteur Fas (APO-1/CD95) est une glycoprotéine transmembranaire de type I qui appartient à la famille des Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR). A l'état basal, il est présent à la membrane cellulaire sous forme trimérique grâce à la séquence PLAD (PreLigand Assembly Domain) qui est située sur son domaine extracellulaire (Chan et al, 2000) (Figure 34).

Fas Ligand (FasL/CD95L/CD178) est une protéine transmembranaire de type II. Ce ligand possède un domaine présent chez tous les membres de la famille du TNF qui permet son homo-trimérisation et ainsi sa fixation sur les domaines CRD (Cystein Rich Domain) de Fas (Lettau et al, 2010) (Figure 34). FasL est présent sous deux formes : une forme membranaire et une forme soluble obtenue après clivage par des métalloprotéases (Mitsiades et al, 2001; Schulte et al, 2007). Les rôles pro- ou non-apoptotiques de chacune des deux formes de FasL sont souvent sujets à controverse. Récemment, O'reilly *et al.* a pu montrer que l'induction de l'apoptose est induite par le FasL membranaire (LA et al, 2009). En effet, ils ont créé des souris génétiquement modifiées pour exprimer uniquement le FasL membranaire ou le FasL soluble et montré que l'absence de FasL membranaire réduit considérablement l'activité cytotoxique des LT. De plus, sans FasL membranaire, il y a développement d'une lymphadénopathie (symptôme similaire à des souris *gld* mutées pour FasL) caractéristique d'une perturbation de l'activation-induced cell death (AICD) dans l'homéostasie immune. A l'inverse, FasL soluble promeut une autoimmunité et la tumorigénèse *via* des processus non-apoptotiques. Le domaine intra-cytoplasmique de FasL régule négativement son expression à la

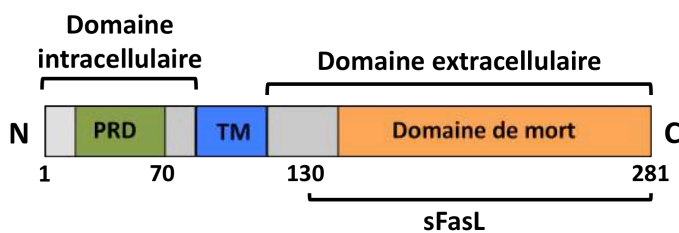


membrane plasmique et participe à l'activité cytotoxique de FasL. Ce domaine intra-cytoplasmique peut également induire des signaux de costimulation (Jodo et al, 2005; Sun et al, 2006a).

### Récepteur Fas



### Fas Ligand



*Figure 34 : Structure de Fas et FasL*

#### *ii. Expression*

L'expression de Fas est ubiquitaire mais dans certaines conditions cette expression peut être augmentée physiologiquement, comme par exemple à la surface des LT après activation de ces derniers et sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Mullbacher et al, 2002).

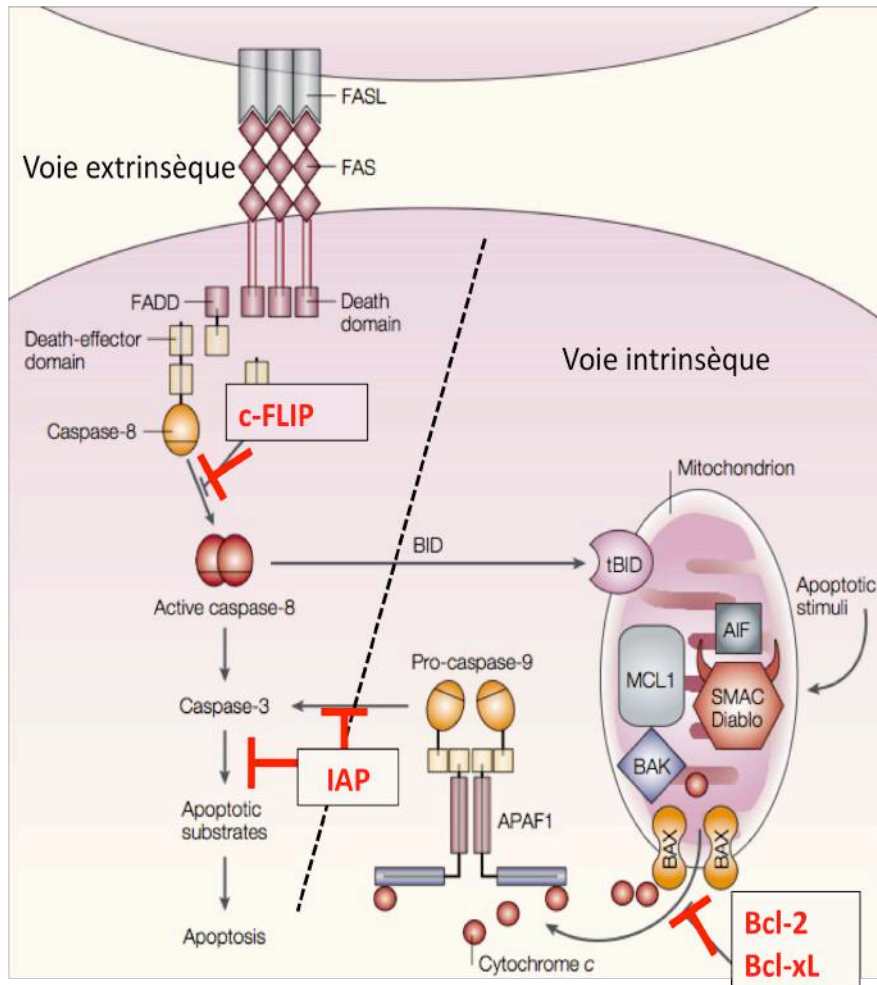
FasL est uniquement exprimé à la surface des lymphocytes activés : LT et NK (Lettau et al, 2010). L'expression de FasL est induite lors de l'activation des LT. FasL est également exprimé de façon constitutive sur les cellules présentes dans les sites de privilège immun, comme les yeux et les testicules, le cerveau et le placenta, où la réponse inflammatoire doit être finement contrôlée (Griffith et al, 1995). L'expression de FasL a aussi été observée dans différents types tumoraux comme des carcinomes colorectaux (Shimoyama et al, 2001), hépatocellulaires (Kykalos et al, 2012) ou des mélanomes (Hahne et al, 1996).

#### *iii. Signalisation*

La fixation de FasL en homotrimer sur son récepteur Fas pré-associé induit la formation d'un microagrégat de récepteurs (Algeciras-Schimmich et al, 2002) (Figure 35). Suite à cette fixation, la protéine adaptatrice FADD est recrutée au niveau des domaines de mort du récepteur Fas (Chinnaiyan et al, 1995). A son tour, FADD recrute la procaspase-8 qui grâce à son domaine DED (Death Effector Domain) initie la formation du DISC (Death-inducing Signalling Complex) (Peter & Krammer, 2003). C'est la forte concentration locale de procaspase-8 au niveau du DISC qui va induire sa propre activation par clivage (Dickens et al, 2012).

A ce niveau, la quantité de caspase-8 activée oriente les cellules vers l'un des deux types de signalisation possibles : la signalisation des cellules de « type 1 » comme les thymocytes ou celle des cellules de « type 2 » comme les hépatocytes (Hao & Mak, 2010) (Figure 35). Dans les cellules de « type 1 », il y a activation d'une grande quantité de caspase-8, qui clive directement les pro-caspases effectrices en aval, comme la procaspase-3. Cette dernière clive ses propres substrats pour aboutir à une mort par apoptose. A l'inverse, dans les cellules de « type 2 », la quantité de caspase-8 activée est insuffisante, il y a alors mise en place d'une boucle d'amplification. Pour cela, la caspase-8 clive Bid en tBid, qui migre ensuite au niveau de la membrane mitochondriale externe. Cette signalisation se poursuit dans la mitochondrie en coopération avec Bax et Bak qui forment des pores à travers la membrane mitochondriale (Hao & Mak, 2010). Les mitochondries sécrètent alors des facteurs apoptogéniques comme le cytochrome c. Ce cytochrome c libéré s'associe avec Apaf-1, dATP et la procaspase-9 pour former le complexe appelé apoptosome. La caspase-9 est ainsi activée et peut à son tour cliver et activer la procaspase-3 (Riedl & Salvesen, 2007) (Figure 35). La libération par les mitochondries d'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et d'EndoG (Endonucléases G) vers le cytosol et leur translocation dans le noyau conduit à la dégradation de l'ADN (Han et al, 2006).

D'autres facteurs sont libérés par la mitochondrie comme Smac/Diablo et HtrA2/Omi. Ces protéines participent indirectement à l'activation de la caspase-3 car elles inhibent les IAPs (Inhibitors of APotosis) dont la fonction est d'inhiber des caspases effectrices (Wei et al, 2008). Les protéines mitochondriales Bcl-2 ou Bcl-xL sont anti-apoptotiques car elles empêchent l'oligomérisation de Bax et de Bak nécessaire à la formation des pores dans la membrane mitochondriale. Enfin, le DISC induit par Fas permet aussi le recrutement d'autres protéines, notamment la protéine FLIP (FLICE or Caspase 8 Inhibitory Protein) qui inhibe l'activation de la procaspase-8 et qui par conséquent bloque l'apoptose (Chang et al, 2002) (Figure 35).



**Figure 35 : Les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose (adapté de (Pope, 2002))**

La voie extrinsèque est déclenchée par la trimérisation de Fas suivie de la formation du DISC. La caspase-8 est activée en quantité suffisante pour activer à son tour la caspase-3 qui va aboutir à l'apoptose. La voie intrinsèque correspond à une boucle d'amplification du signal par relargage du cytochrome c de la mitochondrie. Le cytochrome c s'associe avec APAF-1/Caspase-9 pour permettre l'activation de la caspase-3. Les inhibiteurs des voies d'apoptose (c-FLIP, IAP, Bcl-2, Bcl-xL) sont présentés en rouge.

#### **iv. Fonctions physiologiques**

- **Homéostasie immune**

FasL est essentiel dans le maintien de l'homéostasie immune et dans la prévention de l'auto-immunité (Green et al, 2003). Alors que l'activation des LT naïfs conduit à une expansion clonale et une différenciation des lymphocytes, la stimulation répétée de ces LT activés engendre une apoptose par AICD (Figure 36). En effet, ces stimulations répétées induisent l'expression membranaire de FasL sur les LT, qui à son tour provoque la mort de ces mêmes lymphocytes. Cette mort peut survenir de deux manières différentes : soit une mort par « suicide » où le LT exprime à la fois FasL et Fas (action autocrine), soit une mort « fratricide » entre deux LT voisins exprimant FasL et Fas (action paracrine) (Brunner et al, 2003). Cette AICD qui survient après des stimulations répétées permet de mettre fin aux réponses immunes lorsqu'elles ne sont plus nécessaires.

Ce rôle majeur dans l'homéostasie a pu être mis en évidence notamment par la découverte des souris appelées *lpr* (lymphoprolifération) et *gld* (syndrome lymphoprolifératif généralisée), qui sont mutées pour les gènes codant pour Fas et FasL respectivement (Nagata & Suda, 1995). Ces souris n'expriment plus de Fas ou de FasL et elles développent des pathologies très graves comme des lymphadénopathies, des splénomégalies, des accumulations d'une population inhabituelle de LT (Thy-1+CD4-CD8-CD3+B220+) et des troubles auto-immuns (Takahashi et al, 1994; Watanabe et al, 1995). L'équivalent chez l'Homme des souris *lpr* correspond au syndrome ALPS (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome). La majorité de ces patients sont porteurs d'une mutation germinale de Fas (Rieux-Laucat et al, 2003; Shah et al, 2014).

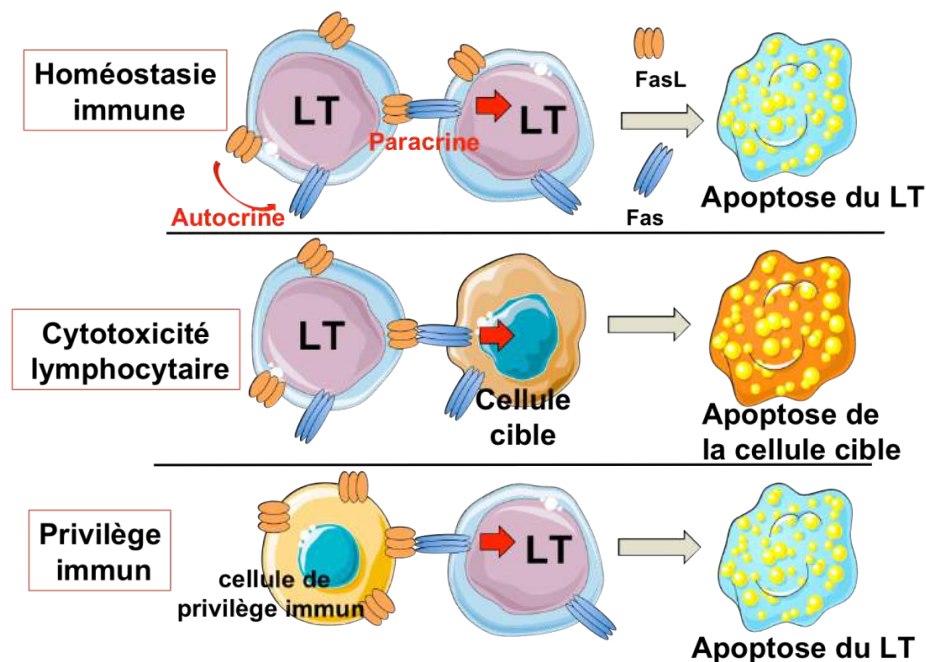


Figure 36 : Fonctions physiologiques de la voie Fas/FasL

- Cytotoxicité lymphocytaire

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les cellules NK éliminent les cellules cibles par deux mécanismes (Figure 36). D'une part, FasL est exprimé à la surface des effecteurs activés. FasL se fixe sur le récepteur Fas exprimé à la surface des cellules cibles et engendre une apoptose cellulaire des cellules cibles. D'autre part, les CTL sécrètent des perforines et granzymes dans l'espace intercellulaire aboutissant aussi à l'apoptose des cellules cibles (Figure 20).

- Privilège immun

Les sites de privilège immun sont des organes contrôlant de manière particulière les réponses inflammatoires et immunes (Figure 36). Ces sites empêchent la propagation d'inflammations puisque des épisodes inflammatoires, même de courte durée, peuvent menacer l'intégrité et la fonction de

l'organe en question. Les organes concernés sont : l'oeil, les testicules, le placenta et le cerveau. Ce privilège immun est assuré par différents mécanismes tels que : la présence de barrières anatomiques (hémato-encéphalique, hémato-rétinienne, hémato-testiculaire) (Caspi, 2006; Fijak et al, 2011), l'expression de la molécule non classique CMH-Ib, l'expression de FasL ou de molécules de surface qui inhibent le complément, la sécrétion de TGF- $\beta$  ou de neuropeptides sur les cellules de ces organes. Concernant FasL, son expression permet de contrôler la prolifération des cellules lymphoïdes Fas+ pénétrant l'organe concerné et qui sont susceptibles d'y créer des dommages (Ferguson & Griffith, 2006; Streilein, 2003).

#### v. Les rôles non-apoptotiques de Fas et FasL

En plus de son rôle majeur dans l'apoptose, les fonctions non-apoptotiques de la voie Fas/FasL sont importantes (Brint et al, 2013). Ainsi, des études ont montré que Fas transduit un signal de prolifération dans les LT primaires activés par leur CD3 (Alderson et al, 1993). De faibles doses d'agonistes de Fas déclenchent une signalisation conduisant à l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPK. Cette signalisation augmente la prolifération des LT de façon équivalente à une costimulation classique *via* CD28 (Paulsen et al, 2011). Cette stimulation de prolifération induite *via* Fas a aussi été retrouvée dans des fibroblastes ou des cellules tumorales (Shinohara et al, 2000). Récemment, l'équipe de Chen a montré que la présence de FasL et de Fas est essentielle à la prolifération *in vitro* et à la croissance tumorale *in vivo* des diverses lignées tumorales (Chen et al, 2010). Cet impact sur la croissance tumorale dépend de l'activation de la voie JNK et ERK induite *via* Fas.

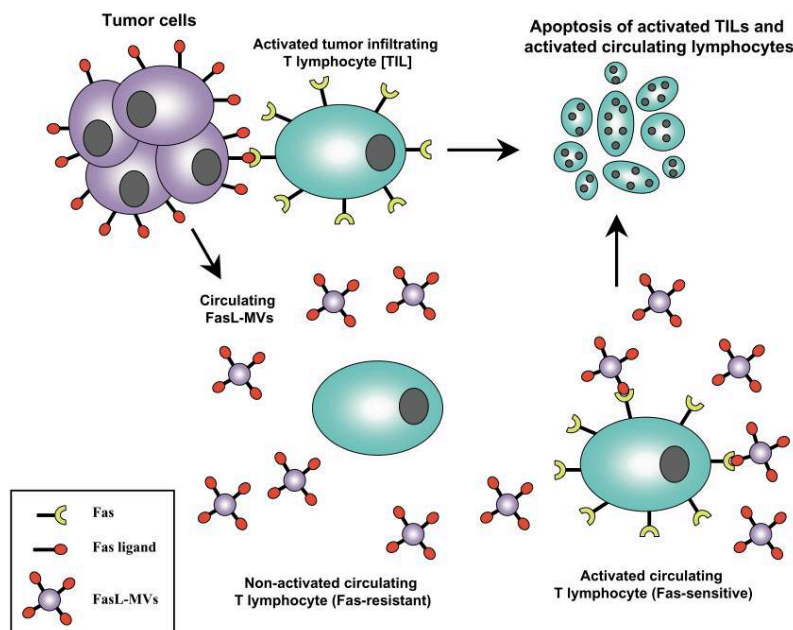
Enfin de nombreuses autres études ont mis en évidence que la signalisation induite par la liaison de FasL sur Fas déclenche la migration et l'invasion des cellules, en particulier dans les cellules malignes Fas+ résistantes à l'apoptose (Cai et al, 2012; Li et al, 2009). Par exemple, dans des tumeurs du pancréas, TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) protège de l'apoptose mais augmente également leurs capacités d'invasion cellulaire médiées par Fas (Trauzold et al, 2005). Dans des cellules de glioblastomes, l'activation de Fas induit le recrutement des protéines Yes (kinases de la famille Src) et des sous-unité p85 de la PI3 kinase, ce qui favorise l'expression de MMP2 et MMP9 et par conséquent l'invasion tumorale (Kleber et al, 2008).

#### vi. Arguments en faveur d'un rôle pro-tumoral de FasL

L'expression de FasL a été observée dans différents types tumoraux comme des carcinomes colorectaux (Shimoyama et al, 2001), hépatocellulaires (Kykalos et al, 2012) ou des mélanomes (Hahne et al, 1996). L'impact de l'expression de FasL sur le développement des tumeurs est sujet à controverse.

De nombreux travaux montrent que l'expression de FasL à la surface des cellules tumorales permet d'induire un signal de mort aux LT activés exprimant la molécule Fas (Andreola et al, 2002; Hahne et

al, 1996; Zhu et al, 2005) (Figure 36). Le mécanisme le plus fréquemment décrit est connu sous le nom de “modèle de contre-attaque” (Igney & Krammer, 2005) car ce sont les cellules tumorales exprimant FasL qui éliminent les LT anti tumoraux et non l’inverse. Hahne et ses collaborateurs (Hahne et al, 1996) ont été les premiers à montrer la capacité de FasL à conférer un privilège immunitaire aux cellules tumorales de mélanome *in vivo*. De plus, la croissance de cellules de mélanomes FasL positives est augmentée dans des souris mutées pour le récepteur Fas suggérant que, dans des souris sauvages (où Fas n’est pas muté), les cellules tumorales FasL+ éliminent les LT Fas+ anti tumoraux qui ralentissent le développement tumoral. De plus, il a été également rapporté que des cellules de mélanomes sécrètent des microvésicules exprimant FasL et sont capables d’induire l’apoptose de cellules Jurkat (Andreola et al, 2002) (Figure 37). L’expression de FasL sur certaines tumeurs peut être considérée comme un facteur de mauvais pronostic. En effet, des travaux ont montré que les tumeurs colorectales métastasées expriment plus fréquemment FasL que les tumeurs primaires (Belt et al, 2014). Enfin, des études réalisées dans des carcinomes de foie montrent que l’expression de Fas et de FasL dans les tumeurs constitue un facteur pronostic négatif significatif en terme de survie sans progression (Kykalos et al, 2012). Récemment, l’équipe de G. Coukos a découvert que les cellules endothéliales dans des tumeurs humaines (sein, prostate, colon) expriment FasL après stimulation par du VEGF ou de l’IL-10. Cette expression ectopique de FasL agit comme une barrière protectrice pour la tumeur en lysant des LT CD8+ infiltrant la tumeur. Dans ce contexte, les LTreg deviennent résistants à l’apoptose grâce à la surexpression de c-FLIP (Motz et al, 2014). Toutes ces études montrent donc que l’expression tumorale de FasL aide les cellules tumorales à échapper au rejet immunitaire par déléation des LT Fas+ spécifiques de la tumeur.



**Figure 37 : La contre-attaque tumorale par FasL (Bohana-Kashtan & Civin, 2005)**

Les cellules tumorales expriment FasL à leur surface et induisent l’apoptose des TIL Fas+. Les cellules tumorales peuvent aussi sécréter des microvésicules exprimant FasL en membrane (FasL-MV) pour éliminer les TIL Fas+ par apoptose.

### **vii. Arguments en faveur d'un rôle anti tumoral de FasL**

A l'inverse, des études mettent en évidence un rôle de FasL *in vivo* dans la mise en place d'une réponse immune pro-inflammatoire anti tumorale (Igney et al, 2005). Ainsi, des cellules tumorales exprimant FasL injectées chez la souris sont plus rapidement rejetées que les cellules tumorales négatives pour FasL. Il s'avère que ce rejet est largement associé à une infiltration de neutrophiles (Arai et al, 1997; Seino et al, 1997) (Arai PNAS 1997, Seino Nat Med 1997). De plus, dans un modèle de mélanome murin, Chen et ses collaborateurs (Chen et al, 1998) montrent que la surexpression du gène FasL au site tumoral entraîne le rejet des tumeurs. Cet effet est accompagné d'une importante infiltration par des neutrophiles inflammatoires. Par ailleurs, l'équipe de Tagawa (Wada et al, 2007) a montré que les niveaux d'expression de FasL à la surface de lignées de mélanomes déterminent le type de réponse tumorale. Dans ce travail, il a été mis en évidence qu'un faible taux de FasL induit *in vivo* l'apoptose des LT anti tumoraux et donc un échappement tumoral. A l'inverse, une forte expression de cette protéine favorise le rejet tumoral associé à l'infiltration de neutrophiles puis de LT anti tumoraux.

Plus récemment, une étude a montré que FasL induit une réponse anti tumorale quand il est exprimé dès le départ sur une lignée de cancer du poumon. Cette expression de FasL initiale permet d'agir avant l'installation du microenvironnement tumoral (Chiu et al, 2013). A l'inverse, si l'expression de FasL est décalée après l'inoculation des cellules tumorales, alors le microenvironnement tumoral est déjà bien installé ce qui abolit l'effet de FasL.

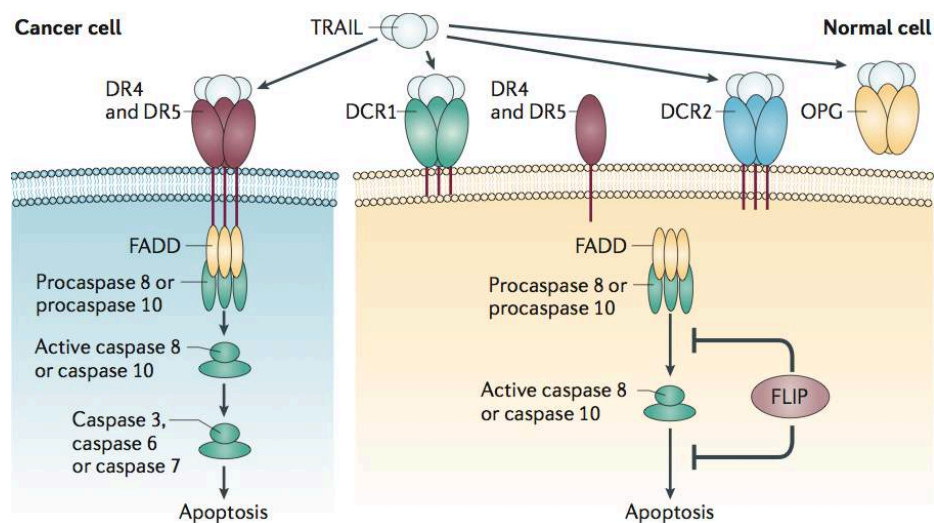
### **e. L'induction de l'apoptose des effecteurs immuns par la voie TRAIL**

La molécule TRAIL (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand) est un autre membre de la famille du TNF. TRAIL est exprimé par de nombreux tissus et lignées cellulaires. Cinq récepteurs de TRAIL ont été identifiés TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) et l'ostéoprotégérine (Prasad et al, 2014) (Figure 38). Les récepteurs DR4 et DR5 sont deux récepteurs qui induisent des voies de signalisation conduisant à l'apoptose de la cellule cible. Les trois autres récepteurs sont en revanche incapables d'induire un signal apoptotique et sont qualifiés de "récepteurs leurres" (Dc : Decoy Receptor). L'engagement des récepteurs pro-apoptotiques DR4 et DR5 par la molécule TRAIL induit un signal de mort et une voie de signalisation très similaire à celle de la voie Fas : activation de FADD, recrutement de la procaspase-8 au niveau du DISC, activation de la voie des caspases ou de la voie mitochondriale (LeBlanc & Ashkenazi, 2003) (Figure 38). TRAIL peut être impliqué dans l'activité cytotoxique des LT et cellules NK au même titre que FasL.

Mais une particularité de TRAIL réside dans le fait que les cellules tumorales semblent être très sensibles à l'induction de la voie de TRAIL, contrairement aux cellules saines (Allen & El-Deiry,



2012; Ashkenazi et al, 1999). C'est la raison pour laquelle, le ciblage thérapeutique de TRAIL dans le cancer est très intéressant (Stuckey & Shah, 2013). Néanmoins, à l'image de la voie de Fas, des résistances tumorales ont été démontrées au niveau de la signalisation de DR4 et de DR5. En effet, une surexpression de protéines anti apoptotiques bloquant la voie de signalisation de DR4 et DR5, comme Mcl-1, a été mise en évidence dans des glioblastomes (Murphy et al, 2014). De plus, des mutations inactivatrices de la caspase-8 sont présentes dans certains carcinomes colorectaux (Kim et al, 2003) et on peut aussi détecter soit une surexpression des récepteurs leurres (DcR1) dans l'ostéosarcome (Bouralexis et al, 2003) soit à l'inverse une dérégulation de l'expression de DR4 dans les mélanomes (Bae et al, 2008).



**Figure 38 : Signalisations apoptotique et non-apoptotique de TRAIL et ses différents récepteurs (Wu & Lippman, 2011)**

### **B. Les modifications extrinsèques de la tumeur**

Les tumeurs ont développé d'autres moyens d'échappement au SI. Pour cela, elles créent autour d'elles un microenvironnement suppresseur (Figure 32). Les cellules immunes effectrices qui se trouvent dans ce microenvironnement sont inhibées localement même s'il a été montré *in vitro* qu'elles restent fonctionnelles (Radoja et al, 2000). Pour inhiber les cellules immunes effectrices, les cellules tumorales produisent des cytokines immunosuppressives et recrutent des cellules immunes suppressives. Ces cytokines immunosuppressives produites par les cellules tumorales sont de plusieurs types essentiellement : Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Shi et al, 2014b), TGF- $\beta$  (Fujita et al, 2009), IL-10 (Sun et al, 2014c), Indoleamine 2,3-DiOxygenase (IDO) (Chevolet et al, 2014).

Les cellules suppressives recrutées dans le microenvironnement tumoral par les chimiokines attractantes des tumeurs sont des Treg et des MDSC ou les macrophages en type M2 pro-tumoraux (précédemment décrits). Ces cellules produisent à leur tour des cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGF- $\beta$ ), expriment des molécules de corépression (CTLA-4, PD-1L) et consomment l'IL-2 nécessaire à l'activation des CTL (Vesely et al, 2011).



Je viens de décrire une liste non exhaustive des armes utilisées par le SI pour lutter contre les cellules cancéreuses et les éliminer. Néanmoins, suite à la sélection induite par le SI lui-même, les tumeurs ont réussi à développer de nombreux mécanismes pour lui échapper. C'est pourquoi la mise en place d'un traitement efficace contre le mélanome nécessite un ciblage thérapeutique réfléchi et judicieux. De ce fait, les nouvelles immunothérapies à venir devront autant reposer sur l'amélioration du volet activateur des réponses immunes que sur l'inhibition du volet immunosuppresseur.

# CHAPITRE 3 – Les GTPases Rho

## I. Généralités

Les GTPases Rho appartiennent à la superfamille des GTPases RAS (Wennerberg JCS 2005). Cette superfamille est constituée de cinq sous-familles (Figure 39), impliquées dans différents processus cellulaires :

- les protéines RAS contrôlent la prolifération, la différenciation cellulaire et l'expression génique (Tetlow & Tamanoi, 2013),
- les protéines RAB contrôlent le trafic vésiculaire (Zerial & McBride, 2001),
- les protéines ARF sont impliquées dans la formation et le trafic des vésicules (Cherfils, 2014),
- les protéines RAN régulent le transport nucléaire et l'organisation des microtubules lors de la mitose (Matchett et al, 2014),
- Enfin, les protéines Rho qui sont des connecteurs moléculaires essentiels pour diverses fonctions cellulaires comme l'organisation du cytosquelette, la motilité cellulaire ou l'expression génique (Heasman & Ridley, 2008)

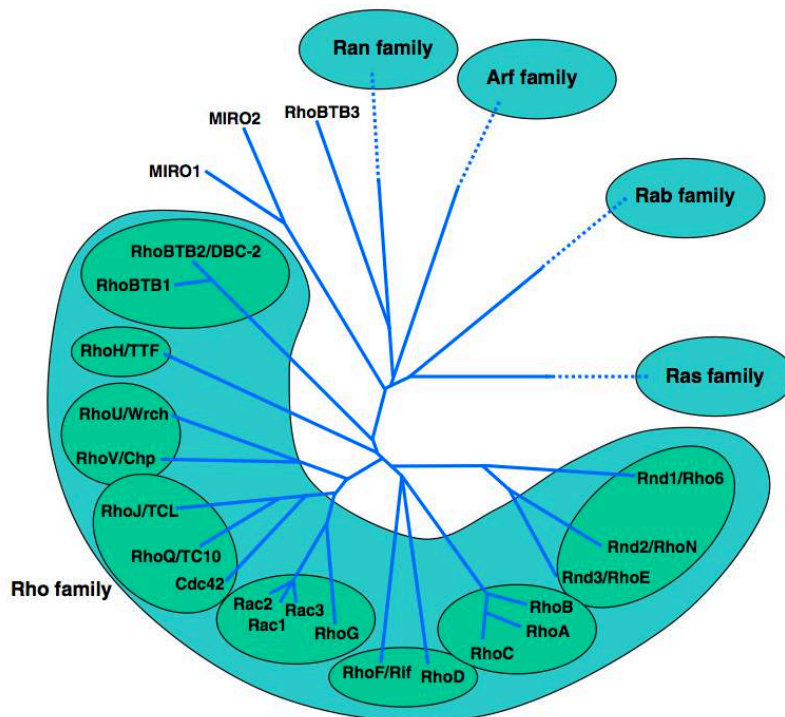


Figure 39 : Arbre phylogénétique des GTPases de la superfamille Rho (Vega & Ridley, 2008)

Les GTPases de la famille Rho sont des protéines G monomériques de faibles masses moléculaires de 20 à 40 kDa. On distingue 20 membres répartis en huit sous-familles (Figure 39) :

- Rho (RhoA, B et C),
- Cdc42/RhoJ/RhoQ,
- Rnd (Rnd1, Rnd2 et Rnd3/RhoE),

- RhoD/RhoF,
- Rac (Rac1, 2 et 3 et RhoG),
- RhoU/RhoV,
- RhoH,
- RhoBTB1 et RhoBTB2.

## II. Structure

Les GTPases Rho sont très conservées au cours de l'évolution. Elles partagent environ 30% d'identité de séquence avec les protéines RAS et de 40% à 95% d'identité entre elles (Wennerberg & Der, 2004). Elles sont essentiellement constituées :

- d'un domaine GTPasique
- d'une partie N-terminale : le domaine effecteur où se lient les différents effecteurs ou régulateurs en conformation active et les domaines de liaison au GDP/GTP
- d'une région C-terminale dite hypervariable car elle concentre la majorité des différences entre les GTPases Rho. Cette région se termine par une boîte CAAX, où C est une cystéine, A un acide aminé aliphatique et X un acide aminé quelconque sur lequel se greffent différentes modifications post-traductionnelles nécessaires à la localisation et à l'activité des GTPases Rho (Hodis et al, 2012) (Figure 40).

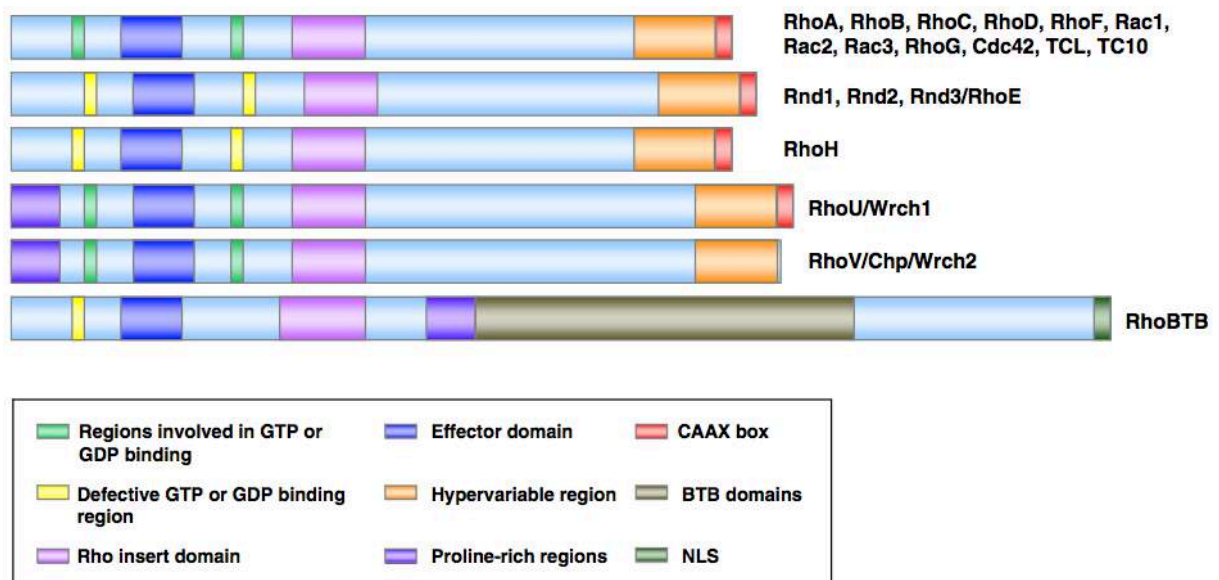


Figure 40 : Structure des GTPases Rho (Hodis et al, 2012)

### **III. Régulation**

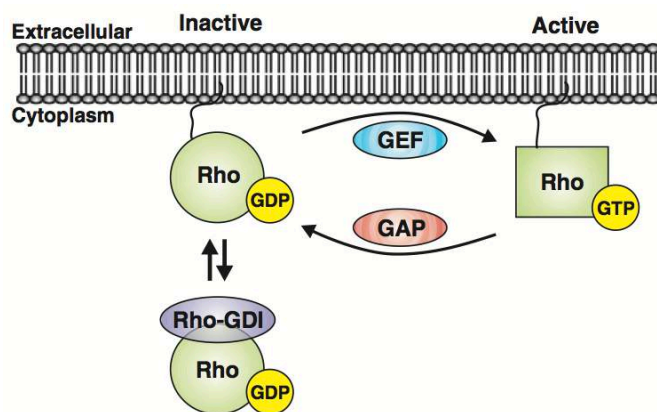
#### **Modifications post-traductionnelles par isoprénylation**

Pour être actives, les GTPases Rho doivent subir une prénylation irréversible sur la cystéine de la boîte CAAX. Elle consiste en l'ajout d'un groupement lipidique insaturé à 15 atomes de carbones, le farnésyl-pyrophosphate (farnésyl-PP), ou à 20 atomes de carbones, le géranylgeranyl-pyrophosphate (géranylgeranyl-PP) (Wennerberg & Der, 2004). Ces groupements isoprénylés sont liés à la protéine Rho grâce à la FarnésylTransférase ou la GéranylGéranylTransférase respectivement. Le type de groupement isoprénylé ajouté dépend de l'acide aminé X présent dans la boîte CAAX. En effet, en présence d'une sérine ou une méthionine, un farnésyl-PP sera greffé (RhoE, RhoN, RhoD...) alors que ce sera un géranylgeranyl-PP s'il s'agit d'une leucine (RhoA, RhoC, RAC1, CDC42...) (Moores et al, 1991). La GTPase RhoB est un cas particulier car elle peut fixer soit un farnésyl-PP, soit un géranylgeranyl-PP. Ce processus est primordial pour l'activité de la Rho GTPase car il permet sa translocation et son ancrage à la membrane cellulaire, où elle est activée et interagit avec ses effecteurs (Roberts et al, 2008).

Il existe également d'autres modifications post-traductionnelles des GTPases Rho telles que la palmitoylation, la phosphorylation, la glucosylation ou l'ubiquitination (Visvikis et al, 2010). Elles modifient la localisation subcellulaire des RhoGTPases, leur activité, leur signalisation ou encore leur stabilité (Liu et al, 2012).

### **IV. Cycle GDP/GTP**

Les GTPases Rho sont des connecteurs moléculaires cyclant entre un état inactif lié au GDP (Guanosine DiPhosphate) et un état actif lié au GTP (Guanosine TriPhosphate) (Figure 41). La liaison au GTP entraîne un changement conformationnel des protéines permettant ainsi leur liaison avec les effecteurs (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Ce cycle de liaison GDP/GTP nécessite l'intervention de protéines régulatrices. Les protéines Guanine nucléotide Exchange Factor (GEF) (80 membres) favorisent l'échange d'un GDP par un GTP activant ainsi les GTPases (Goicoechea et al, 2014; Lazer & Katzav, 2011). A l'inverse, les GTPases Activating Proteins (GAP) (70 membres) catalysent l'hydrolyse du GTP et ramènent donc les Rho dans un état inactif (Moon & Zheng, 2003; Tcherkezian & Lamarche-Vane, 2007). Enfin, les GDP Dissociation Inhibitor (GDI) séquestrent dans le cytoplasme la GTPase Rho inactive liée au GDP en emprisonnant le motif isoprénique, empêchant ainsi sa réactivation par les GEF. Les GDI sont constituées de deux domaines distincts. Le domaine N-terminal, interagissant avec le switch 1 des GTPases Rho, est responsable de l'inhibition de la dissociation du GDP (Ota et al, 2015). Le domaine C-terminal, qui se lie au switch 2, forme une poche hydrophobe où vient se glisser le lipide isoprénique séquestrant ainsi les protéines dans le cytoplasme (Figure 41).



**Figure 41 : Le cycle d'activation des GTPases Rho (Huveneers & Danen, 2009)**

Les Rho-GDIs (Rho-GDP Dissociation Inhibitors) séquestrent la forme inactive Rho-GDP dans le cytoplasme. Une fois libérées des Rho-GDIs, les Rho-GTPases sont ciblées à la membrane plasmique où leur cycle d'activation est régulé par les GEFs qui permettent le chargement en GTP et l'activation des Rho-GTPases. L'inactivation des Rho-GTPases se fait via les GAPs qui permettent l'hydrolyse du GTP en GDP

## V. La GTPase RhoA

Parmi les membres de la famille Rho, RhoA (poids moléculaire  $\approx 24$  kDa) est l'une des mieux caractérisées. La première fonction pour laquelle elle a été décrite est la régulation du cytosquelette d'actine. RhoA est également impliquée dans bien d'autres fonctions cellulaires comme : la transcription (Staus et al, 2014), le trafic vésiculaire (Ridley, 2006), la contraction musculaire (Zhang et al, 2015), la motilité cellulaire (Jackson et al, 2011), la prolifération, la polarité cellulaire ou encore l'apoptose (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Thumkeo et al, 2013). Ainsi, RhoA est une protéine essentielle pour la biologie de la cellule. Ce pourquoi la délétion complète de RhoA (knockout) dans des souris est létale au cours de l'embryogénèse (Pedersen & Brakebusch, 2012). Toutes les fonctions citées ci-dessus se font grâce à la coopération de RhoA avec ses différents effecteurs : ROCK, mDia (Mammalian homolog of Drosophila Diaphanous), Citron kinase ou encore la Rhotékinase. Au cours de ma thèse je me suis particulièrement intéressé aux kinases ROCK.

## VI. ROCK

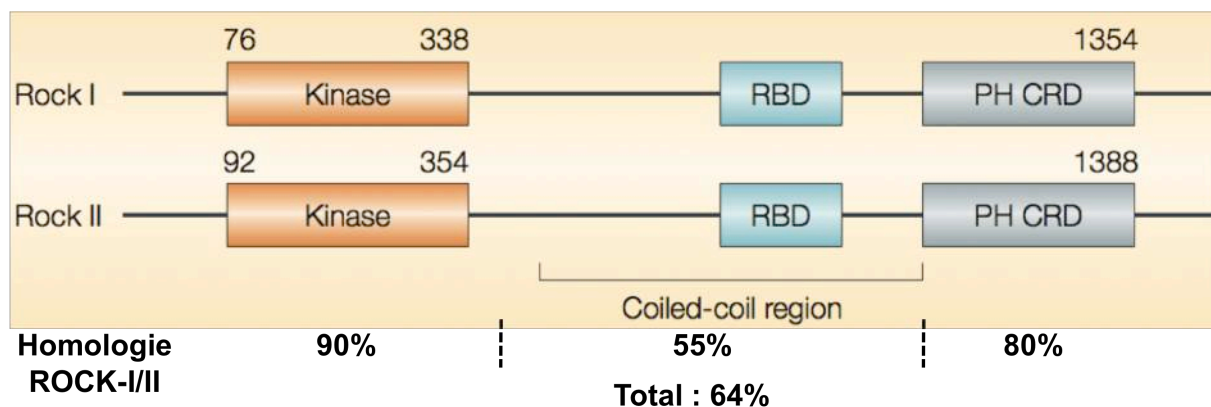
### 1. Structure

Les kinases ROCK (Rho-associated, Coiled-coil Containing Protein Kinase) font partie des plus importants effecteurs des Rho. Elles sont surtout connues pour interagir avec RhoA et RhoC.

Les ROCK sont des protéines kinases (d'environ 160 kDa) ciblant spécifiquement les résidus sérine/thréonine. Deux isoformes de ROCK existent : ROCK-I et ROCK-II. (Matsui et al, 1996; Nakagawa et al, 1996). La structure moléculaire des ROCK comprend (Figure 42) :

- le domaine kinase localisé vers l'extrémité N-terminal

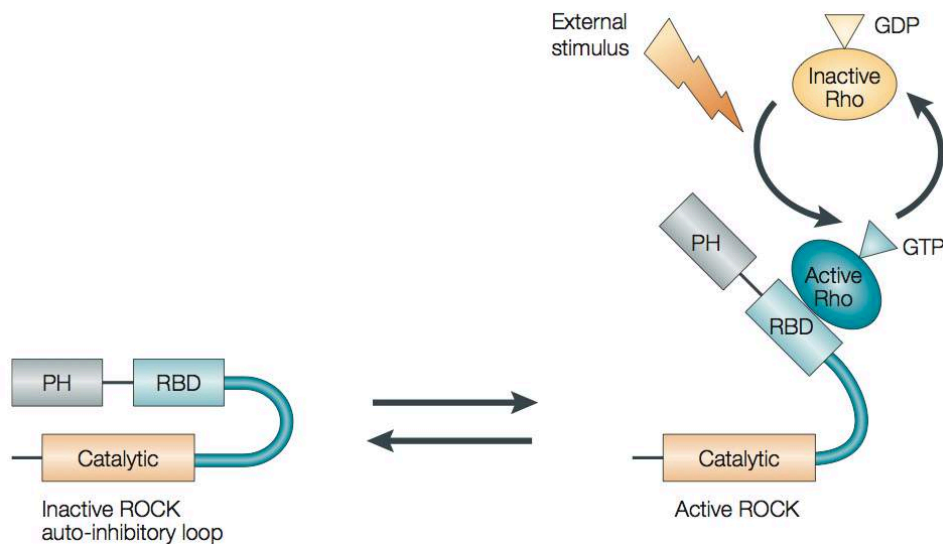
- un domaine appelé “coiled-coil domain” (domaine auto-inhibiteur) en C-terminale. Ce “coiled-coil domain” est composé d’une région RBD (Rho-binding domain) où se fixe la GTPase Rho
- une région PH (Pleckstrin-Homology domain) avec un domaine CRD (Cysteine-Rich Domain) en C-terminal
- ROCK-1 et ROCK-2 partagent 64% d’identité de séquence selon la séquence globale en acides aminés, dont 58% dans la région RBD et 92% dans le domaine kinase (Figure 42) (Mueller et al, 2005).



**Figure 42 : Structure moléculaire des kinases ROCK-I et ROCK-II (adapté de (Mueller et al, 2005))**

ROCK-I et ROCK-II sont exprimées de façon ubiquitaire, avec une expression préférentielle de ROCK-I dans les poumons, le foie, les reins, la rate et les muscles squelettiques alors que ROCK-II est plutôt exprimé dans le cerveau et le coeur (Schofield & Bernard, 2013). Leur activation est contrôlée par différents mécanismes.

Le domaine coiled-coil est impliqué dans l’auto-inhibition de l’activité des ROCK. En effet, il permet le repliement de l’extrémité C-terminale sur le domaine kinase en N-terminal (Amano et al, 1999; Amano et al, 2000). Lorsqu’elle est inactive, la kinase ROCK est dans une conformation repliée (Figure 43). La liaison de la RhoA-GTP à la région RBD stimule l’activité des ROCK en dissociant le domaine kinase de la région auto-inhibitrice située dans l’extrémité C-terminale (Dvorsky et al, 2004) (Figure 43). L’acide arachidonique ainsi que la sphingosine phosphorylcholine sont également capables de stimuler l’activité des ROCK, en interférant avec la région auto-inhibitrice de l’extrémité C-terminale, surtout sur le domaine PH (Araki et al, 2001). De plus, les ROCK peuvent être activées par un clivage de la région auto-inhibitrice sous l’effet de la caspase-3 ou du granzyme B (Sebbagh et al, 2005; Sebbagh et al, 2001). Enfin, l’activité de ROCK-1 est aussi négativement régulée par la GTPase RhoE. La liaison de RhoE au domaine kinase de ROCK empêche la liaison de la Rho-GTP sur le domaine RBD de ROCK (Riento et al, 2003).

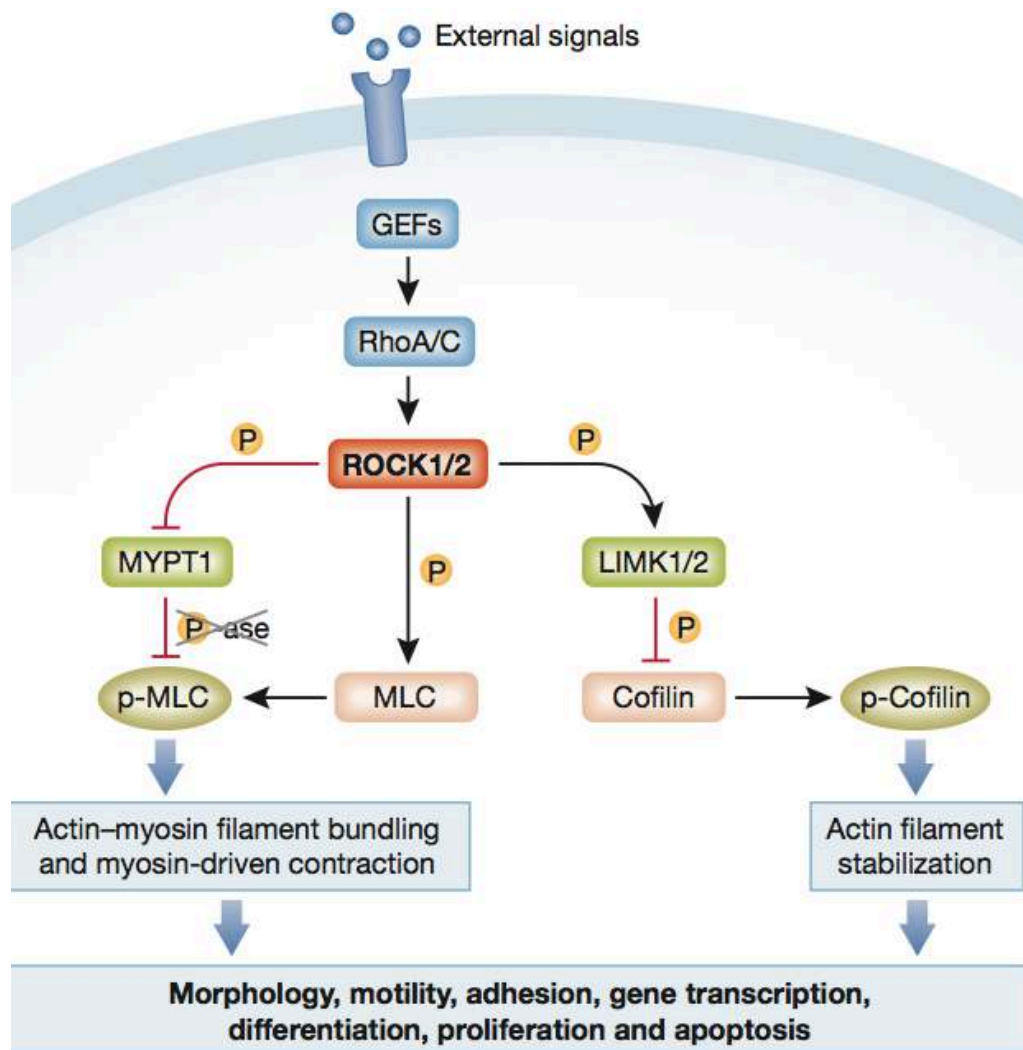


**Figure 43 : Mécanismes de régulation de l'activité des ROCK (Mueller et al, 2005)**

Le repliement de l'extrémité C-terminale sur le domaine catalytique kinase de ROCK entraîne une boucle d'auto-inhibition des ROCK. La fixation de la Rho-GTP active sur le domaine RBD va rompre cette boucle d'auto-inhibition et donc activer ROCK.

## 2. Fonctions

La fonction la plus connue des ROCK est la régulation du cytosquelette d'actine et de la contractilité de l'actino-myosine. La contractilité du couple actine/myosine dépend de l'état phosphorylé ou déphosphorylé de la MLC (Myosin Light Chain) induite par la MLCK (MLC Kinase) ou la MLCP (MLC Phosphatase) respectivement. ROCK interagit avec MYPT-1 qui est une sous-unité de MLCP. ROCK phosphoryle MYTP-1 ce qui inhibe l'activité de MLCP (Chu et al, 2012; Riddick et al, 2008). De ce fait, la MLC se retrouve préférentiellement dans un état phosphorylé ce qui provoque une contractilité actine-myosine plus importante. De plus, il est aussi connu que ROCK peut directement phosphoryler la MLC au niveau de la sérine 19. ROCK peut aussi phosphoryler LIMK1 et LIMK2 (LIM domain Kinase). Ces kinases se retrouvent ainsi activées et elles phosphorylent à leur tour la cofiline ce qui va stabiliser les filaments d'actine (Rath & Olson, 2011) (Figure 44).



**Figure 44 : Les kinases ROCK régulent le cytosquelette d'actine par deux mécanismes principaux (Rath & Olson, 2011)**

ROCK favorise la phosphorylation de la MLC soit de façon directe soit en inhibant la MLC Phosphatase ce qui permet d'augmenter la contraction et la polymérisation des fibres d'actines. ROCK phosphoryle LIMK qui phosphoryle la cofiline ce qui stabilise les filaments d'actine.

A l'image de RhoA, les kinases ROCK interviennent aussi, en fonction des substrats avec lesquels elles interagissent, dans diverses fonctions cellulaires comme : l'apoptose, la migration cellulaire, l'adhésion cellulaire, la prolifération ou encore le développement embryonnaire (Abe et al, 2014; Julian & Olson, 2015; Shi et al, 2013; Xu et al, 2012).

Les GTPases Rho et ses effecteurs sont particulièrement impliqués dans les différents types de migrations cellulaires physiologiques ou tumorales, comme la migration mésenchymale et la migration amoéboïde (Vega & Ridley, 2008). La migration mésenchymale est caractérisée, par l'acquisition d'un phénotype de type fibroblastique : les cellules émettent des prolongements cellulaires et des points focaux d'adhésion, elles synthétisent des MMP pour dégrader la matrice extracellulaire (MEC) ce qui leur permet d'avancer (Radisky & Radisky, 2010).



La migration amoéboïde est caractérisée par une morphologie ronde sans prolongements et par une faible interaction avec la MEC. Le remodelage du réseau d'actine sous-corticale induit des bourgeonnements dus à la contraction de l'actomyosine. Ces bourgeonnements permettent aux cellules d'avancer en se déformant entre les fibres de la MEC (Lammermann & Sixt, 2009; Pinner & Sahai, 2008).

Les GTPases RhoA et RAC jouent des rôles inverses dans l'induction des deux types de migration. La migration mésenchymale est dépendante de la GTPase Rac car elle active WAVE2 qui induit un phénotype mésenchymal et inhibe la voie RhoA/ROCK (Sanz-Moreno et al, 2008). A l'inverse, la voie RhoA/ROCK induit un phénotype amoéboïde et inhibe la formation des protrusions mésenchymales (Kosla et al, 2013). La migration amoéboïde, du fait qu'elle ne nécessite pas le temps de dégradation de la MEC, est considérée comme plus agressive que la migration mésenchymale.

## **VII. La voie RhoA/ROCK dans les réponses immunes**

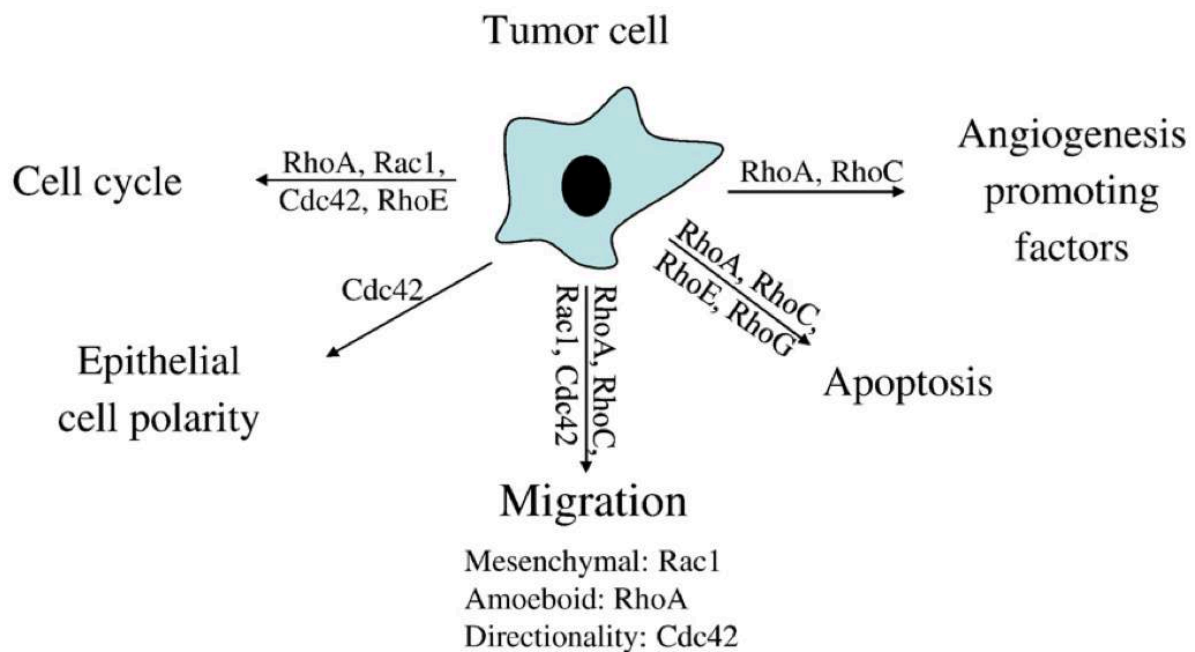
Les GTPases Rho participent à plusieurs niveaux de la régulation de la réponse immunitaire : dans la sélection thymique, la présentation antigénique, l'activation et la cytotoxicité lymphocytaire (Cantrell, 2003). Ainsi, concernant la cytotoxicité, la voie de signalisation RhoA/ROCK/LIMK permet la réorganisation du cytosquelette d'actine et la redistribution des granules cytotoxiques des cellules NK. Ces modifications permettent aussi la polarisation des LT cytotoxiques vers leurs cibles (Lou et al, 2001). La cytotoxicité lymphocytaire dépendante de la voie FasL est, elle aussi, régulée par les GTPases Rho. Blanco-Colio et ses collaborateurs démontrent en effet que l'augmentation de la transcription du gène codant la protéine FasL dans les LT transfectés par la forme active de la GTPase RhoA est associée à une augmentation de la fonction lytique de ces cellules (Blanco-Colio et al, 2003).

Concernant l'activité des LT : l'équipe de Anne Ridley a montré que la voie RhoA/ROCK contribue à la migration et à la polarité des LT en régulant la contractilité actinomyosine et la stabilité des microtubules (Takesono et al, 2010). De plus, une analyse transcriptomique a mis en évidence que RhoA joue un rôle important dans les progéniteurs des LT. En effet, RhoA est nécessaire à l'expression des facteurs de transcription Egr-1 et AP-1 qui sont essentiels dans le développement des thymocytes (Mullin et al, 2007). De façon intéressante, la même étude a aussi montré que la transcription du marqueur d'activation lymphocytaire précoce CD69 est contrôlée par RhoA.

Par ailleurs, des virus codant des mutants dominant-négatifs ou dominant-positifs des GTPases Rho (RhoA, RAC1, CDC42) ont permis de montrer le rôle régulateur de ses protéines dans la mise en place d'une réponse immune adaptative dépendante des CD (Shurin et al, 2005). De plus, la voie RhoA/ROCK/LIMK/Cofilin/Myosin II est aussi impliquée dans la signalisation des CD et dans le contrôle de l'induction de la réponse immune adaptative (Xu et al, 2014).

### VIII. Les GTPases Rho dans l'oncogénèse

Les GTPases Rho sont impliquées dans un grand nombre de fonctions cellulaires, il est de ce fait évident que leur dérégulation participe au processus oncogénique (Ellenbroek & Collard, 2007; Vega & Ridley, 2008) (Figure 45). Une prolifération incontrôlée et une augmentation de la survie conduisent à l'initiation et à la croissance tumorale, alors qu'un remodelage du cytosquelette augmente la motilité cellulaire pouvant conduire à un phénotype métastatique. Les GTPases Rho, qui interviennent au niveau du contrôle de la prolifération cellulaire, du cytosquelette et de l'angiogénèse sont donc impliquées dans diverses étapes de l'oncogénèse (Ellenbroek & Collard, 2007; Vega & Ridley, 2008).



**Figure 45 : Processus tumoraux majeurs régulés par les GTPases Rho (Karlsson et al, 2009)**

Malgré leur importance dans la tumorigénèse, les GTPases Rho sont très rarement mutées dans les cancers. En effet, à ce jour, seuls les gènes codants pour RhoH ou RAC1 présentent une mutation activatrice dans des tumeurs myéloïdes (Preudhomme et al, 2000) ou dans les mélanomes respectivement (Krauthammer et al, 2012). Très récemment, il a été découvert un ensemble de mutations dans RhoA dans des carcinomes gastriques (entre 15% et 25% des patients). La plupart de ces mutations concernent le domaine de liaison aux effecteurs ou au GTP (Kakiuchi et al, 2014; Wang et al, 2014). RAC1 et CDC42 ont aussi été retrouvés mutés dans des lignées de mélanome (Hodis et al, 2012).

En revanche, l'expression ou l'activité des GTPases Rho apparaissent très souvent dérégulées dans de nombreux cancers (Alan & Lundquist, 2013; Karlsson et al, 2009) (Tableau 3). La majorité des GTPases Rho a un rôle transformant alors qu'à l'inverse RhoB a des propriétés de suppresseur de tumeur avec une expression réprimée dans certaines tumeurs (Karlsson et al, 2009; Mazieres et al,

2004; Mazieres et al, 2007). Dans les mélanomes, plusieurs auteurs ont rapporté une surexpression de RhoA, RhoC et RhoE dans les métastases (Chardin, 2006; Clark et al, 2000; Sahai, 2007).

**Tableau 3 : Altération des GTPases Rho dans les cancers (adapté de (Alan & Lundquist, 2013; Karlsson et al, 2009))**

GTPase Rho	Altération	Cancer
RhoA	Surexpression	Testicules Foie Poumon Œsophage Ovaire Mélanome
RhoB	Diminution d'expression	Poumon Glioblastome Tête et cou
RhoC	Surexpression	Mélanome Poumon Sein Pancréas Ovaire

### **IX. Les kinases ROCK dans l'oncogénèse**

Une surexpression ou une sur-activation des kinases ROCK peuvent aussi contribuer à l'initiation et à la progression tumorale.

Des mutations somatiques des gènes codant pour ROCK ont été mises en évidence dans des lignées cellulaires de cancer et des tumeurs primaires. ROCK-I est muté en Y405 et S1126 dans des cancers du sein et en P1193 dans des cancers du poumons (Greenman et al, 2007; Lochhead et al, 2010). Ces trois mutations augmentent l'activité kinase due à l'absence d'autoinhibition. ROCK-II est retrouvé muté en Y1174 et S1194P dans des carcinomes primaires d'estomac et des lignées de mélanomes, induisant aussi une plus forte activité de la kinase (Greenman et al, 2007). Enfin, à l'inverse, une troisième mutation de ROCK-II en W138 génère une protéine avec un domaine kinase réduit et une activité diminuée (Lochhead et al, 2010).

La surexpression de ROCK-I ou -II est associée dans plusieurs types de cancers à des tumeurs plus agressives et une diminution de la survie des patients. Ainsi, une surexpression de ROCK-I dans le cancer du sein corrèle avec un stade plus avancé et une mauvaise survie globale (Lane et al, 2008). ROCK-I est aussi fortement exprimé dans des ostéosarcomes et là aussi il est associé à une mauvaise survie (Liu et al, 2011). Dans des carcinomes hépatiques, la surexpression de ROCK-II est liée à des tumeurs plus agressives (Wong et al, 2009). Dans le cancer de la vessie, une expression élevée de ROCK-II est corrélée avec une survie sans progression réduite (Kamai et al, 2002; Kamai et al, 2003; Kamai et al, 2004). Dans des carcinomes hépatocellulaires, les surexpressions de ROCK-II, liées à la dérégulation de miR-139 ou miR-124, sont associées à un mauvais pronostic (Wong et al, 2011;

Zheng et al, 2012). La transition du cancer de la prostate hormonodépendant à hormonorésistant est associé à une dérégulation de miR-146a qui inhibe ROCK-I (Lin et al, 2008)

## **X. Utilisation clinique des inhibiteurs de Rho dans le traitement de cancers**

Les GTPases Rho étant impliquées dans toutes les étapes de l'oncogenèse, le développement d'inhibiteurs ciblant cette famille de protéines, à des fins thérapeutiques, a très vite été exploré (Yeganeh et al, 2014). Ainsi, des inhibiteurs de la prénylation des GTPases Rho ont vu le jour sous formes de statines, de GGTI et de FTI (Figure 46).

Les statines, inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, inhibent la prénylation, la farnésylation et la géranylgeranylation des GTPases de la superfamille RAS. Ils sont très largement prescrits pour leur fonction anti-cholestérolémiant mais ils ont aussi été testés dans le traitement de cancer (Demierre, 2005; Walker et al, 2015; Wu et al, 2013). Des études précliniques et cliniques de leur utilisation ont montré des résultats encourageants notamment dans les hépatocarcinomes (McGlynn et al, 2014) et les cancers de la prostate (Moon et al, 2014). De plus, de récentes études suggèrent que les statines, utilisées dans le traitement de maladies cardiovasculaires, possèdent des propriétés préventives contre le cancer du foie (Shi et al, 2014a), même si cette corrélation n'a pas pu être établie dans d'autres cancers (pancréas, prostate) (Cui et al, 2012; Melvin et al, 2014).

Depuis les années 2000, 75 essais cliniques ont été menés avec quatre FTI : Tipifarnib, Lonfarnib, BMS-214662 et L-778123 (Berndt et al, 2014). Ces produits se sont montrés globalement très décevants en thérapie anti cancéreuse. En effet, l'ensemble de ces études a montré que la monothérapie avec un FTI avait une activité anti tumorale limitée dans les cancers hématologiques et généralement pas d'activité thérapeutique dans les cancers solides. Par exemple, pour le Tipifarnib, 28% des essais cliniques n'ont pas montré de réponses objectives et 36% des essais ont montré des taux de réponses inférieurs à 15% dans les cancers hématologiques et solides (Berndt et al, 2014). De manière plus importante, le Tipifarnib et le Lonafarnib, qui sont les seuls à avoir atteint un essai de phase III, n'ont pas induit d'amélioration du pronostic des patients atteints de cancer du pancréas, du colon ou du poumon, en monothérapie ou combinés avec d'autres chimiothérapies classiques (Harousseau et al, 2009; Rao et al, 2004; Van Cutsem et al, 2004).

Les traitements par des GGTI, qui inhibent l'activité des GTPases RhoA, RhoC, RAC et CDC42 en empêchant la fixation du géranylgeranyl-PP, ont montré des résultats encourageants *in vitro* et *in vivo* (Kusama et al, 2003) mais à cause de leur toxicité aucun essai clinique n'a été mené à ce jour (Kazi et al, 2009). Cependant, un nouveau GGTI, le P61A6, est apparu en 2009 et a montré des effets anti tumoraux *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de cancers du poumon et du pancréas (Lu et al, 2009; Zimonjic et al, 2013).

Enfin, des inhibiteurs plus spécifiques des GTPases Rho ont également été développés. Ainsi, le CCG-1423 inhibe la transcription de RhoA (Evelyn et al, 2007) et il est capable d'inhiber l'invasion de

lignées tumorales pancréatiques *in vitro* (Bell et al, 2013; Evelyn et al, 2010). A ce jour, les inhibiteurs de la prénylation des GTPases de la superfamille RAS n'ont pas prouvé leur efficacité mais de nouveaux essais cliniques et de nouvelles associations sont évalués.

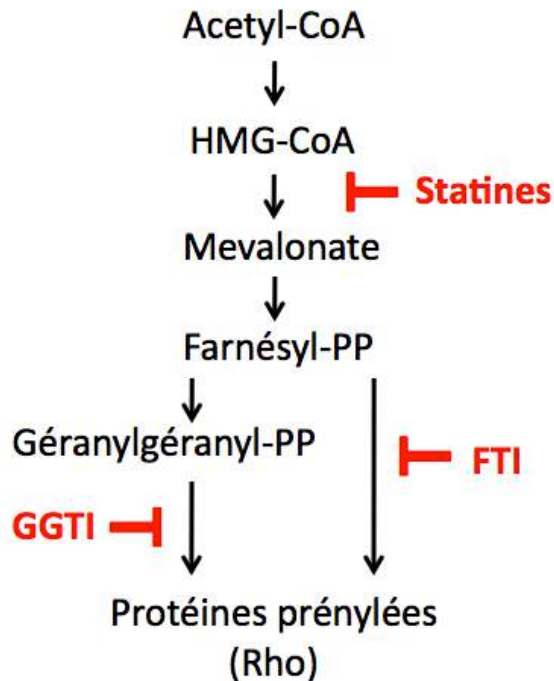


Figure 46 : Voie du mévalonate simplifiée et inhibiteurs

## XI. Thérapies basées sur les inhibiteurs des ROCK

En raison du ciblage pharmacologique des kinases, l'étude d'inhibiteurs des ROCK est plus avancée, d'autant plus que le ciblage des ROCK est plus sélectif et potentiellement moins toxique que le ciblage des Rho GTPases.

Certains inhibiteurs des ROCK sont en utilisation ou en essai clinique pour diverses pathologies. Le Fasudil est actuellement utilisé au Japon pour le traitement du vasospasme cérébral (Suzuki et al, 2008). Ce traitement repose sur les capacités vasodilatatrices du Fasudil. Suite à une étude de surveillance qui a montré la tolérabilité et l'innocuité du Fasudil sur 1400 patients (Zhao et al, 2006), plusieurs essais cliniques sont en cours pour traiter d'autres pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension, l'athérosclérose ou encore les accidents vasculaires cérébraux (Olson, 2008).

Actuellement, aucun inhibiteur des ROCK n'est en essai clinique ou approuvé pour le traitement du cancer. Néanmoins, plusieurs études ont montré des effets anti tumoraux de certains inhibiteurs des ROCK sur des modèles *in vitro* et *in vivo* (Narumiya et al, 2009). En effet, en raison de leur rôle important dans la dynamique du cytosquelette, l'inhibition de l'activité des ROCK semble être bénéfique dans le traitement de tumeurs métastatiques agressives. Ainsi, plusieurs inhibiteurs des ROCK, comme le Fasudil, Wf-536, Y-27632 ou encore RKI-1447, ont induit un ralentissement de la progression tumorale dans des cancers du foie, du poumon, du sein, du mélanome ou du myélocome

(Itoh et al, 1999; Nakajima et al, 2003a; Nakajima et al, 2003c; Patel et al, 2012; Takamura et al, 2001; Wang et al, 2004; Ying et al, 2006). De plus, le Fasudil et Wf-536 atténuent l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de carcinomes pulmonaires (Nakajima et al, 2003b; Zhang et al, 2012b). Le Slx-2119, un inhibiteur sélectif de ROCK-II, a induit un retard de croissance tumorale dose-dépendant dans un modèle de xénogreffe humain avec une toxicité acceptable (Boerma et al, 2008; Morgan-Fisher et al, 2013).

Avec la connaissance croissante de la régulation et des fonctions des ROCK dans différents mécanismes cellulaires, la perspective d'obtenir de nouvelles drogues ciblant les ROCK se rapproche. Ces molécules pourraient à terme être utilisées en thérapie anti tumorale dans le but de réduire la croissance tumorale et la formation de métastases.

# OBJECTIFS DE LA THESE

---

L'incidence du mélanome est en forte augmentation et les traitements actuels ont une efficacité modérée sur les mélanomes métastatiques mais de nouvelles thérapies ciblées et immunothérapies sont encourageantes. L'immunothérapie du mélanome est actuellement une voie thérapeutique en pleine expansion mais elle montre encore des limites et des effets secondaires prouvés. Il est donc toujours nécessaire de trouver de nouvelles molécules pharmacologiques pour amplifier les réponses immunes et pour améliorer les thérapies du mélanome.

L'objectif général de ma thèse est d'étudier les rôles régulateurs des GTPases Rho et de leurs effecteurs, en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, sur l'expression de ligands du système immunitaire, sur des cellules de mélanomes murins et humains, et leurs conséquences sur le développement tumoral. Ceci dans le but de savoir si un jour ces inhibiteurs pourraient devenir des molécules intéressantes dans la thérapie du mélanome.

Au cours de ma thèse, nous avons modulé l'immunogénicité des cellules de mélanome en utilisant différentes molécules pharmacologiques. Ceci dans le but de les évaluer dans des protocoles précliniques d'immunothérapie du mélanome. Nous avons testé des agents pharmacologiques pour évaluer leur capacité à augmenter l'expression tumorale de ligands immuns reconnus par les cellules effectrices des systèmes immunitaires inné et adaptatif.

Nous nous sommes intéressés à trois ligands immuns :

- la molécule de costimulation CD70,
- au ligand MICA reconnu par les cellules NK
- et au ligand d'apoptose FasL.

Nous avons d'abord analysé la régulation de l'expression de ces ligands sur les cellules de mélanome suite à des traitements à des inhibiteurs de la voie des GTPases Rho et de leurs effecteurs ROCK. Nous avons ensuite voulu savoir si la modulation de ces ligands du système immunitaire influençait les réponses immunes anti mélanome. Enfin, nous avons étudié l'impact de ces ligands et de leur régulation sur le développement tumoral et en particulier sur les capacités métastatiques des cellules de mélanome.





# RESULTATS

---

## Résultats I

### **GTPases-independent statin-induced MICA overexpression reduces melanoma development and metastasis**

Christine Pich, **Teiti Iotefa**, Philippe Rochaix, Gilles Favre and Anne-Françoise Tilkin-Mariamé

Article publié dans *Frontiers in immunology* (13 mars 2013;4:62. doi:10.3389/fimmu.2013.00062)

L'incidence du mélanome a été multipliée par trois au cours de ces vingt dernières années (Belot et al, 2008). Actuellement, les thérapies classiques du mélanome métastatique sont peu efficaces. C'est pourquoi de nouvelles stratégies s'orientent vers l'immunothérapie notamment en recherchant de nouvelles méthodes pour amplifier les réponses immunes.

Les cellules NK sont essentielles dans les réponses immunes anti mélanome grâce à leur capacité à lyser les cellules tumorales. Cette activité cytotoxique anti tumorale dépend fortement du récepteur activateur NKG2D exprimé sur les cellules NK (Zafirova et al, 2011). En effet, des travaux montrent que des souris déficientes en NKG2D meurent précocement de divers cancers (Guerra et al, 2008). Ce récepteur reconnaît plusieurs ligands dont le plus connu est la protéine MICA qui peut être régulée aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel (Eagle & Trowsdale, 2007).

Les statines sont des inhibiteurs pharmacologiques de la HMG-CoA réductase qui permet la synthèse du mévalonate. Le mévalonate étant un précurseur du cholestérol, ces médicaments sont utilisés en thérapies cardiovasculaires et cérébrovasculaires (Yeganeh et al, 2014). Le mévalonate est aussi le précurseur des composés isoprénylés responsables de l'ancrage membranaire des protéines prénylées telles que les GTPases Ras et Rho (Roberts et al, 2008). Ainsi, les statines inhibent la prénylation et l'activité de ces GTPases. Nous avons souhaité déterminer si des inhibiteurs de la voie du mévalonate pourraient favoriser une réponse innée qui participerait au rejet immun des mélanomes.

Les travaux que nous avons entrepris concernent la régulation par les statines de l'expression du ligand MICA sur des lignées de mélanomes humains et l'effet de cette régulation sur la réponse NK. Pour cela, une statine synthétique (l'Atorvastatine) et une statine naturelle (la lovastatine) ont été utilisées. MICA est un ligand humain mais il possède une propriété unique, celle d'être reconnu et d'activer le récepteur NKG2D des cellules NK aussi bien humaines que murines. Le traitement *in vitro* des cellules de mélanome métastatique LB1319-MEL et BB74-MEL avec de l'Atorvastatine induit la surexpression de MICA en membrane et de sa forme totale. Ce traitement n'est pas toxique en lui-même car la prolifération *in vitro* des cellules prétraitées ou non est similaire. De plus, cette

surexpression de MICA est fonctionnelle car elle induit *in vitro* une augmentation de la sensibilité des cellules LB1319-MEL à la lyse par les cellules NK humaines et murines. La surexpression membranaire de MICA suite au traitement à la lovastatine est également observée.

Ensuite, nous avons étudié l'impact du pré-traitement *in vitro* des cellules LB1319-MEL à l'Atorvastatine sur le développement des tumeurs et des métastases induites *in vivo* en injectant ces cellules pré-traitées ou non à des souris NMRI nu/nu. Le suivi de la croissance tumorale, après injection sous-cutanée des cellules LB1319-MEL prétraitées ou non, a montré un ralentissement significatif de la croissance tumorale des cellules prétraitées à l'Atorvastatine. De plus, nous avons étudié l'effet de l'Atorvastatine sur l'implantation métastatique des cellules tumorales dans les poumons des souris. Pour cela, les cellules LB1319-MEL prétraitées ou non à l'Atorvastatine ont été injectées dans la veine caudale de souris NMRI nu/nu. Le marquage des cellules tumorales par de l'Integrisense a révélé que le traitement réduit l'implantation des cellules LB1319-MEL dans les poumons des souris.

Enfin, nous avons voulu déterminer quelles protéines prénylées étaient impliquées dans la régulation de l'expression de MICA sous l'action des statines. Nous recherchions donc une protéine dont l'inhibition favoriserait l'expression de MICA. Comme les statines inhibent la prénylation et l'activité des GTPases Ras et Rho, nous avons ciblé les GTPases RhoA, B, et C, Rac1 et Cdc42 en les inhibant par ARN interférence et les GTPases Ras en les inhibant par un inhibiteur spécifique l'acide S-FarnesylThioSialicylique (FTS). Les résultats montrent que RhoA ne régule pas l'expression de MICA, alors que Rac1, RhoB et RhoC et les GTPases Ras sont plutôt des régulateurs positifs. Ainsi, de façon surprenante, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'implication des GTPases dans la régulation négative de MICA sous l'action de l'Atorvastatine.

Pour trouver ce(s) régulateur(s) négatif(s) de MICA, nous nous sommes intéressés à la voie des PPARs dont l'activité est augmentée par les statines. Et en effet, l'inhibition de PPAR $\gamma$ , avec un inhibiteur pharmacologique (T0070907) ou un plasmide dominant-négatif, a induit une diminution de l'expression membranaire de MICA sur la lignée LB1319-MEL. De plus, un essai gène rapporteur, basé sur l'activité luciférase sous le contrôle d'un promoteur possédant des éléments de réponse à PPAR $\gamma$  a permis de mettre en évidence que l'Atorvastatine favorise l'activité transcriptionnelle de PPAR $\gamma$ . Ainsi, ces résultats suggèrent que les statines activent la voie de PPAR $\gamma$  aboutissant à la surexpression de MICA sur nos lignées de mélanome. De plus, nous avons aussi mis en évidence l'implication de la voie SAPK/JNK dans cette surexpression de MICA induite par l'Atorvastatine.

L'ensemble de ce travail suggère que l'Atorvastatine induit une surexpression de MICA. Cet effet ne dépend pas des GTPases Ras et Rho mais des voies PPAR $\gamma$  et SAPK/JNK. La surexpression membranaire de MICA, induite par le traitement à l'Atorvastatine, favorise *in vivo* l'induction d'une réponse innée anti mélanome qui contrôle le développement tumoral. L'Atorvastatine pourrait donc avoir un intérêt dans l'immunothérapie du mélanome.



# Statins reduce melanoma development and metastasis through MICA overexpression

Christine Pich<sup>1,2,3</sup>, Iotefa Teiti<sup>1,2,3</sup>, Philippe Rochaix<sup>2</sup>, Bernard Mariamé<sup>3,4</sup>, Bettina Couderc<sup>2,3,5</sup>, Gilles Favre<sup>1,2,3</sup> and Anne-Françoise Tilkin-Mariamé<sup>1,2,3</sup>\*

<sup>1</sup> INSERM/UPS UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France

<sup>2</sup> Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

<sup>3</sup> Université Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>4</sup> INSERM/UPS UMR 1043, Physiopathology Center of Toulouse-Purpan, Toulouse, France

<sup>5</sup> EA 4553, University Cancer Clinic, Toulouse, France

## Edited by:

Fabrizio Mattei, Istituto Superiore di Sanità, Italy

## Reviewed by:

Geraldine O. Canny, Geneva Foundation for Medical Education and Research, Switzerland  
Yang Bian, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, USA

## \*Correspondence:

Anne-Françoise Tilkin-Mariamé, INSERM UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse, Institut Claudius Regaud, 20-24, Rue du Pont Saint Pierre, Toulouse 31052, France.  
e-mail: tilkin.anne@claudiusregaud.fr

Survival of melanoma patients after metastases detection remains short. Several clinical trials have shown moderate efficiency in improving patient survival, and the search for pharmacological agents to enhance the immune response and reduce melanoma metastases is still necessary. Statins block the mevalonate pathway, which leads to decreases in GTPase isoprenylation and activity, particularly those of the Ras superfamily. They are widely used as hypocholesterolemic agents in cardiovascular diseases and several studies have shown that they also have protective effects against cancers. Furthermore, we have previously demonstrated that treatment of melanoma cells with inhibitors of the mevalonate pathway, such as statins, favor the development of specific adaptive immune responses against these tumors. In the present study, we tested statin impact on the innate immune response against human metastatic melanoma cells. Our data shows that treatment of two human melanoma cell lines with statins induced a weak but significant increase of MHC class I Chain-related protein A (MICA) membrane expression. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma is involved in this statin-induced MICA overexpression, which is independent of Ras and Rho GTPase signaling pathways. Interestingly, this MICA overexpression makes melanoma cells more sensitive to *in vitro* lysis by NK cells. The impact of statin treatment on *in vivo* development of melanoma tumors and metastases was investigated in nude mice, because murine NK cells, which express NKG2D receptors, are able to recognize and kill human tumor cells expressing MICA. The results demonstrated that both local tumor growth and pulmonary metastases were strongly inhibited in nude mice injected with statin-treated melanoma cells. These results suggest that statins could be effective in melanoma immunotherapy treatments.

**Keywords: statins, melanoma, MICA, NK cells**

## INTRODUCTION

Cutaneous melanomas are the most aggressive skin cancers. They arise from melanocytes and, after horizontal and vertical growth, extravasate into the draining lymph nodes and blood vessels, from which they can metastasize. Patient survival following metastatic detection is usually short. Therefore, current treatments target metastatic growth. Inhibitors of BRAF mutated V600E were validated by several clinical trials but their efficiency is not long lasting and is mostly restricted to BRAF V600E mutated tumors (Flaherty et al., 2010; Weeraratna, 2012). Other treatments with antibodies directed against the CTLA-4 molecule have shown efficiency in metastatic melanoma (Hodi et al., 2010), but these antibodies can also induce deleterious inflammation (Berman et al., 2010). Thus, the search for pharmacological agents to enhance the immune response to reduce melanoma metastases is still necessary.

Statins are used by millions of people as hypocholesterolemic agents in cardiovascular and cerebrovascular diseases. Additionally, retrospective studies have shown that, besides this

hypocholesterolemic activity, statins can also have a protective effect against the development of cancers, particularly melanomas (Boudreau et al., 2010; Jacobs et al., 2011). Statins are HMG-CoA reductase inhibitors, which block the mevalonate synthesis pathway. By inhibiting this metabolic pathway, statins also inhibit the activity of numerous GTPases of the Ras superfamily as they require the isoprenoid chains, synthesized from the mevalonate, for their function and localization (Rikitake and Hirata, 2009). Statins also have pleiotropic effects, including the enhancement of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) activities (Balakumar and Mahadevan, 2012). PPAR $\gamma$  is a transcription factor that is overexpressed in several types of cancer (Peters et al., 2012), particularly melanomas (Meyer et al., 2009).

We have previously shown that treatments of melanoma cells with mevalonate pathway pharmacological inhibitors, notably statins, and in combination with IFN $\gamma$  favor the anti-tumor adaptive immune response by inducing MHC class I and costimulatory molecule (CD80/CD86) overexpression (Tilkin-Mariame et al.,

2005; Sarraibayrouse et al., 2010). We then asked the question whether or not these inhibitors could also favor the anti-melanoma innate immune response. We were particularly interested in NK cells, which are among the most efficient effectors of the innate immune system and also recognize several molecules expressed on the surface of both stressed and tumor cells. A critical receptor expressed on NK cells is the NKG2D activating receptor, which is able to recognize tumor cells from murine or human origin (Cerwenka and Lanier, 2001; Fuertes et al., 2008). On tumor or stressed cells, this type II transmembrane receptor recognizes ligands, such as UL-Binding Proteins (ULBPs) and MHC class I Chain-related protein A (MICA) and B (MICB), all related to the MHC class I molecules (Lanier, 2008). NKG2D expression is essential for NK cell control of tumor development, as illustrated by NKG2D-KO mice, which develop numerous tumors and die prematurely (Guerra et al., 2008).

In the present study, we analyzed statins' ability to regulate MICA expression in human melanoma cells and the consequences of this treatment on melanoma development. We demonstrated that treatment of two human melanoma cells with atorvastatin or lovastatin induced a weak but reproducible MICA membrane overexpression, provoking an increase of melanoma cell sensitivity to NK cell lysis *in vitro*. Moreover, we observed *in vivo* that atorvastatin pretreatment of these melanoma cells strongly reduced both local melanoma growth following subcutaneous injection as well as pulmonary metastases implantation after intravenous injections. This data suggests that statins could be interesting pharmacological inhibitors for melanoma immunotherapy as they favor the innate immune response against tumor cells.

## RESULTS

### STATIN TREATMENT INDUCES MICA OVEREXPRESSION AND INCREASES MELANOMA SENSITIVITY TO NK-KILLING

We tested whether treatment of human melanoma cells with statins could render these cells more immunogenic and more sensitive to NK cell destruction. LB1319-MEL human melanoma cells were treated for 48 h with 5  $\mu$ M atorvastatin. This treatment induced a 2.2-fold total MICA protein enhancement (Figure 1A) and also weakly enhanced MICA membrane expression (Figures 1B,C), but not the deleterious cleavage of membrane expressed MICA (Figure 1D). The 5  $\mu$ M dose of atorvastatin for 48 h was chosen after dose-response experiments as illustrated in Figure A1A in Appendix. This atorvastatin treatment is not toxic to LB1319-MEL cells, as their *in vitro* proliferation rate following treatment is still similar to the control (Figure 1E). Similar results were obtained with another human melanoma cell line, BB74-MEL, which was treated with atorvastatin at 5 or 10  $\mu$ M. Similar to LB1319-MEL cells, the BB74-MEL cells also exhibited weak membrane MICA overexpression in response to statins (Figure A1B in Appendix) without increasing the cleavage of membrane expressed MICA (Figure A1C in Appendix) or toxicity (Figure A1D in Appendix).

Recent studies showed that the increase of MICA and MICB expression on target tumor cells induced an increase in sensitivity to lysis by NK cells (Zhang et al., 2009; Chavez-Blanco et al., 2011). We therefore tested whether or not atorvastatin plays a role in increasing the sensitivity of melanoma cells to NK

cell-mediated death. We isolated fresh NK cells from C57BL/6 splenocytes using magnetic cell separation (Miltenyi Biotec) and cocultivated them for 1 h with LB1319-MEL target cells either untreated or pretreated with atorvastatin. FACS analysis of tumor cell lysis showed that atorvastatin treatment induced a twofold increase in LB1319-MEL cell death as compared to untreated target cells (Figure 1F). In this experiment, corresponding to previously shown data, murine NK cells were able to recognize and kill human target cells by interaction of their NKG2D receptors with specific ligands expressed on human target cells, such as MICA, MICB, and ULBP (Cerwenka and Lanier, 2001; Fuertes et al., 2008).

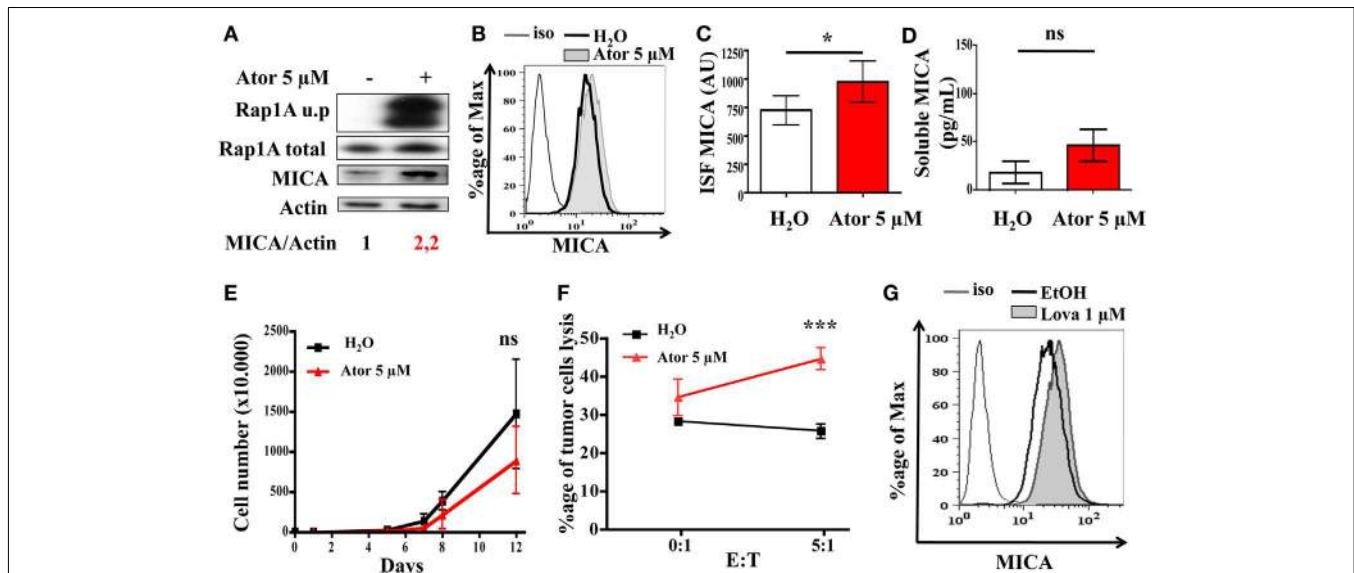
To test whether another statin could also induce MICA membrane overexpression, LB1319-MEL cells were treated with 1  $\mu$ M lovastatin for 48 h and MICA expression was analyzed by flow cytometry. The 1  $\mu$ M dose of lovastatin was chosen after dose-response experiments as illustrated in Figure A1E in Appendix. Similarly to atorvastatin, lovastatin induced a weak MICA membrane overexpression (Figure 1G).

Altogether, this data shows that statin treatment of human melanoma cells enhanced MICA protein and membrane expression and that these treatments were not toxic, but increased the sensitivity of the tumor cells to NK-induced cell death *in vitro*.

### ATORVASTATIN TREATMENT OF LB1319-MEL CELLS SLOWS TUMOR GROWTH AND REDUCES METASTATIC PULMONARY IMPLANTATION

Based on our *in vitro* conclusions, we wondered if atorvastatin treatment of melanoma cells could increase sensitivity to the anti-tumor innate immune response in a mouse model. In summary, we performed subcutaneous injections of LB1319-MEL cells, either untreated or pretreated with 5  $\mu$ M atorvastatin for 48 h, into the flank of nude mice. We were not able to perform this assay with BB74-MEL cells, as they do not grow in the nude mice. The resulting tumors showed that LB1319-MEL cells pretreated with atorvastatin grew drastically ( $p < 0.005$ ) slower than untreated cells (Figure 2A). Interestingly, two mice among the six injected with pretreated LB1319-MEL cells rejected their tumor (Figure 2C), whereas no rejection was observed among the mice injected with untreated LB1319-MEL cells (Figure 2B). These results are consistent with the statin-induced MICA overexpression and enhancement of *in vitro* tumor cell death by NK cells. Furthermore, we used two other human melanoma cell lines: LB2033-MEL and LB583-MEL. These cells are MICA negative and remained negative following atorvastatin treatment as illustrated in Figure A2A in Appendix. We injected subcutaneously these melanoma cells either untreated or pretreated, as LB1319-MEL, with 5  $\mu$ M atorvastatin. The resulting tumors showed that negative MICA cells both pretreated and untreated grew similarly (Figures A2B,C in Appendix). These results confirmed the involvement of statin-induced MICA overexpression in the tumor growth.

We also tested the effect of atorvastatin treatment on the *in vitro* migration of the LB1319-MEL cells. We did not observe any significant difference between the migration of treated and untreated cells (Figures A2D,E in Appendix). This data suggested that the atorvastatin-induced slow-down of *in vivo* tumor growth is not linked to an inhibition of tumor cells migration.



**FIGURE 1 | Statin treatment induces MICA overexpression and increases NK-dependent cytotoxicity.** LB1319-MEL cells were treated with 5  $\mu$ M atorvastatin for 48 h (Ator) or untreated ( $H_2O$ ). The atorvastatin treatment efficiency was controlled by the analysis of Rap1A unphosphorylation (Rap1A u.p) compared to the total protein (Rap1A total) (A). MICA total expression was analyzed by western blot (A), membrane expression by flow cytometry (B,C), and cleavage by ELISA (D) ( $n=3$ ). To evaluate membrane antigen expression, the index of specific fluorescence (ISF) was calculated as indicated in the Section "Materials and Methods" (C). Results are expressed as mean  $\pm$  SD (error bars,  $n=5$  experiments (C) or 3 experiments (D)). \* $P < 0.5$ ; versus

control condition using the Student *t*-test. Every 2–3 days pretreated (Ator) and untreated ( $H_2O$ ) LB1319-MEL cells were counted to evaluate the *in vitro* proliferation (E). ns; versus control condition using the two-way ANOVA test. Percentage of lysed LB1319-MEL cells pretreated (Ator) or untreated ( $H_2O$ ) after coculture with murine NK cells was evaluated with Cytotoxicity kit (Onco-immumin, Interchim). Murine NK cells were first isolated from three C57BL/6 spleens with CD49b MicroBeads (Miltenyi Biotec) (F). \*\*\* $P < 0.001$ ; versus control condition using the two-way ANOVA test. LB1319-MEL cells were treated with 1  $\mu$ M lovastatin for 48 h, and MICA membrane expression was analyzed by flow cytometry (G).

As NK cells play an important role in the control of metastatic processes (Mehlen and Puisieux, 2006), we assessed whether statin-induced MICA overexpression and subsequent sensitivity to the innate immune response could reduce the metastatic processes, more specifically the final step of pulmonary implantation. LB1319-MEL cells either untreated or pretreated with 5  $\mu$ M atorvastatin were injected intravenously into the tail vein of nude mice and the animals were sacrificed 16 days later. Thirty hours before sacrifice, the tumor and neoangiogenesis sensor IntegriSense was injected intravenously (Kimura et al., 2009; Mery et al., 2011; He et al., 2012; Valdivia et al., 2012). This fluorescent reagent allowed visualization and quantification of tumor implantations and neoangiogenesis in the lungs (Figures 2D,E). We observed that untreated LB1319-MEL cells colonized the lungs and induced a considerable neoangiogenesis, while atorvastatin-treated LB1319-MEL cells were less invasive with strongly decreased neoangiogenesis.

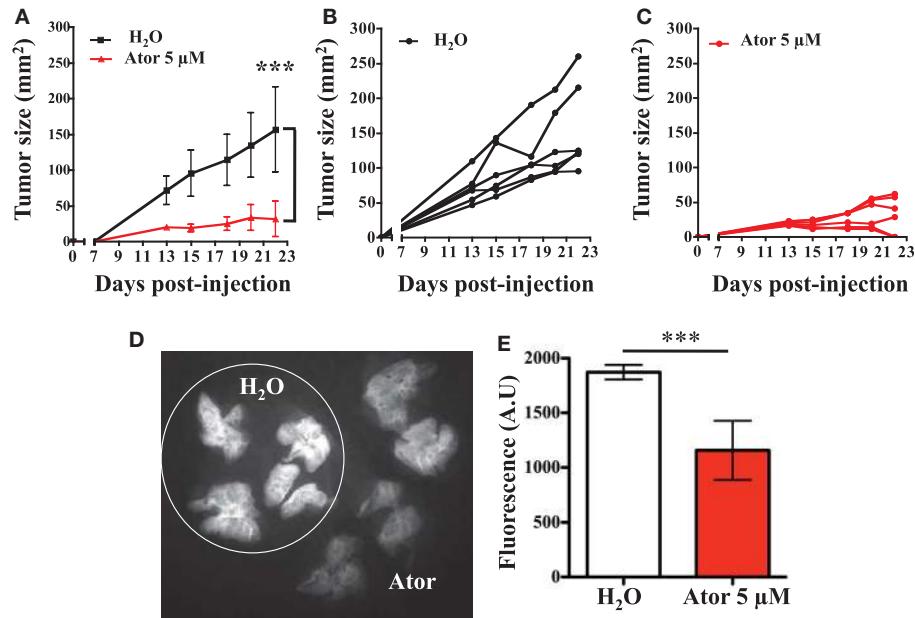
These results showed that statin pretreatment of melanoma cells reduced *in vivo* tumor development and metastasis.

#### INHIBITION OF GTPases OF Ras SUPERFAMILY DOES NOT INDUCE MICA OVEREXPRESSION

Proteins of the Ras superfamily play regulatory roles on essential cellular functions (Heasman and Ridley, 2008). Their activity can be blocked by statin treatment, because statins block mevalonate production by HMG-CoA reductase and consequently inhibit the production of isoprenyl PyroPhosphates (PP), geranyl PP,

and farnesyl PP, which are the precursor molecules necessary to produce isoprenoid chains. These isoprenoid chains bind to the carboxy-terminal end of Ras superfamily proteins and allow adequate cellular localization and activity. To explain why statin treatment induced MICA overexpression, we hypothesized that statin could block a negative regulator of MICA expression. These negative regulatory proteins, blocked by statin treatment, could be isoprenylated proteins of the Ras superfamily.

We first tested the involvement of proteins of the Rho GTPases subfamily. The three highly related Rho isoforms, RhoA, B, and C share some effector proteins, but also show clear functional differences (Heasman and Ridley, 2008). To determine whether these Rho GTPases are involved in the regulation of MICA membrane expression, we used a bacterial inhibitor of RhoA, B, and C (Tat-C3 exoenzyme), which inhibits the Rho proteins activity by inducing ADP-ribosylation of these three GTPases. The results showed that treatment of LB1319-MEL cells with Tat-C3 actually induced downregulation of MICA rather than the expected increase (Figures 3A,B). Therefore, these Rho proteins effectively regulate MICA expression but in a positive way. We then used a siRNA strategy that allows the specific inhibition of RhoA, RhoB, or RhoC, to test whether one of them could behave differently and negatively regulate MICA expression. We first verified that these siRNAs were efficient in reducing RhoA, RhoB, or RhoC protein expression (Figures A3A–C in Appendix) and then tested their impact on MICA expression. Transfection of two RhoA-specific siRNAs in LB1319-MEL cells did not induce any modification



**FIGURE 2 | Atorvastatin treatment inhibits melanoma *in vivo* development and metastasis.** LB1319-MEL cells untreated (H<sub>2</sub>O) or pretreated with atorvastatin 5  $\mu$ M for 48 h (Ator) were injected subcutaneously into the flank of six nude mice. Tumor growth was measured every 2–3 days (A). \*\*\* $P$  < 0.001; versus control condition using the two-way ANOVA test. Tumor growths for each mice are represented (B,C). LB1319-MEL cells untreated (H<sub>2</sub>O) or pretreated with

5  $\mu$ M atorvastatin for 48 h (Ator) were injected intravenously. Fifteen days later IntegriSense was intravenously injected and the mice were sacrificed 30 h later. The lungs appeared fluorescent and the IntegriSense fluorescent signal was analyzed by Fluobeam@camera. The image is representative of one experiment (D). The fluorescent signal was quantified (E). \*\*\* $P$  < 0.001; versus control condition using the Student *t*-test.

of MICA expression (Figure 3C), while cells transfected with RhoB- or RhoC-siRNAs significantly reduced MICA expression as compared to siCtrl (Figures 3D,E). Consequently, these Rho proteins cannot be responsible for the increased expression of MICA induced by statin treatment.

We then tested the impact of siRNA-induced reduction of Rac1 and Cdc42, two other essential members of the Rho family. These proteins are known to be involved in the regulation of several cellular functions, including migration and gene transcription (Heasman and Ridley, 2008). siRNA transfections successfully inhibited Rac1 and Cdc42 expression (Figures A3D,E in Appendix). We observed that Cdc42 inhibition had no statistical effect on MICA expression, while Rac1 inhibition actually reduced MICA expression in LB1319-MEL cells (Figures 3F,G). Altogether, these results show that these Rho proteins are not responsible for the statin-induced overexpression of MICA.

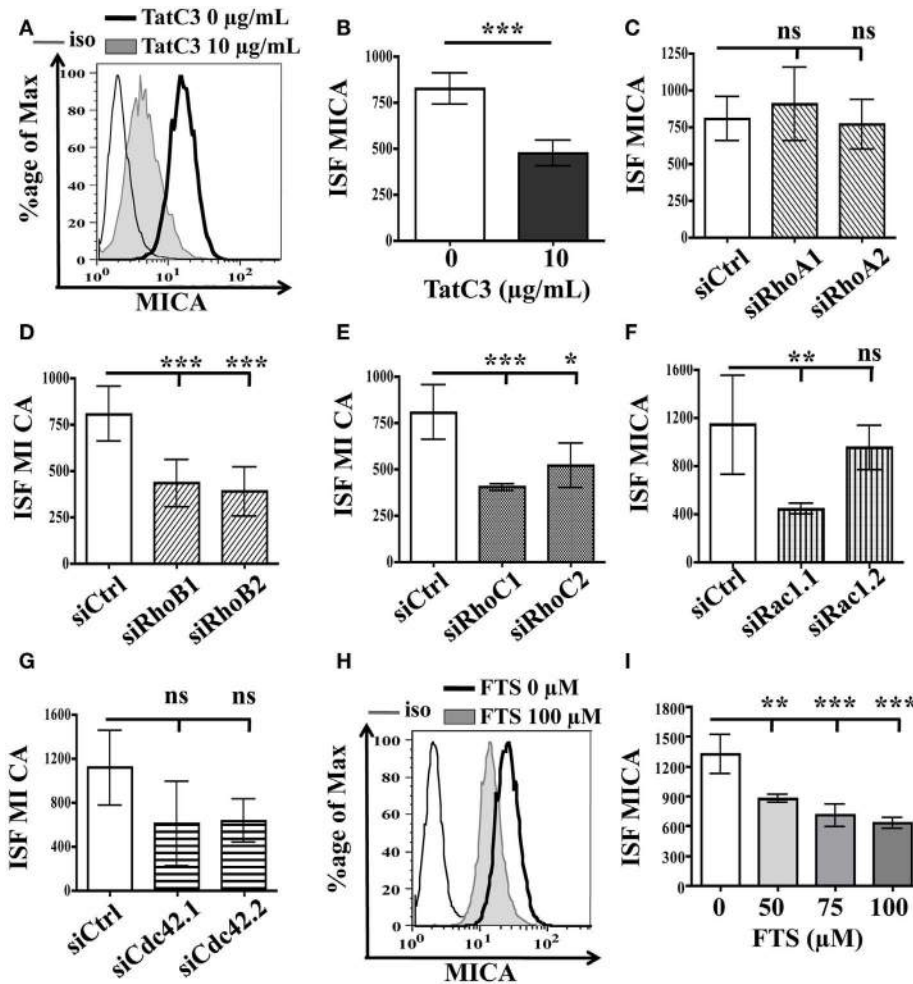
Next, we investigated the role of Ras proteins in statin-induced MICA overexpression. Ras GTPase activities can be inhibited by statin treatment, because these proteins need to be farnesylated on their C-terminal end for membrane anchorage and activity. To determine whether Ras proteins are involved in MICA overexpression, we used a biochemical inhibitor of Ras protein activity (*S*-FarnesylThioSialicylic acid, FTS). The results showed that inhibition of Ras protein activity by FTS (50–100  $\mu$ M for 24 h) also induced a decrease in MICA expression (Figures 3H,I). Therefore, Ras proteins are not responsible for statin-induced MICA overexpression.

#### PPAR $\gamma$ AND SAPK/JNK INVOLVEMENT IN STATIN-INDUCED MICA OVEREXPRESSION

As it is known that statins may affect the PPAR $\gamma$  pathway (Balakumar and Mahadevan, 2012), we checked the involvement of this factor in the statin-induced MICA overexpression. As shown in Figures 4A,B, treatment of the LB1319-MEL cells with T0070907, a specific inhibitor of the PPAR $\gamma$  pathway, led to a weak but significant and reproducible decrease of the membrane MICA expression. Additionally, transfection of an expression vector encoding a dominant negative mutant of PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$  DN) had a similar effect (Figures 4C,D). Furthermore, LB1319-MEL cells transfected with a reporter vector containing three PPAR $\gamma$  Responsive Element (PPRE) cloned upstream of a luciferase gene (pGL4.3xPPRE-FLuc) exhibited a weak but significant increase of the luciferase expression following 5  $\mu$ M atorvastatin treatment (Figure 4E). The treatment of LB1319-MEL cells with increasing doses of atorvastatin, from 0.3 to 10  $\mu$ M, confirmed this data (Figure A4A in Appendix). Finally, CPT1A mRNAs were increased in LB1319-MEL cells following 5  $\mu$ M atorvastatin treatment (Figure A4B in Appendix). This data confirm the involvement of PPAR $\gamma$  pathway since CPT1A is a target gene for PPAR $\gamma$  (Heinaniemi et al., 2007; Szatmari et al., 2007; Sharma et al., 2012). Therefore, it is possible that statins activate the PPAR $\gamma$  pathway, leading to downstream increases in MICA expression.

To assess the possible involvement of other pathways, we then performed a Human Phospho-Kinase Array (R&D systems). The





**FIGURE 3 | Inhibition of Rho and Ras GTPases proteins does not induce MICA membrane overexpression.** LB1319-MEL cells were untreated or treated with TatC3 exoenzyme (TatC3) 10 µg/mL for 24 h (A,B). LB1319-MEL cells were transfected with control siRNA (siCtrl) (C–G), two RhoA-specific siRNAs (siRhoA1, siRhoA2) (C), two RhoB-specific siRNAs (siRhoB1, siRhoB2) (D), two RhoC-specific siRNAs (siRhoC1, siRhoC2) (E), two Rac1-specific siRNAs (siRac1.1, siRac1.2) (F), or two Cdc42-specific siRNAs (siCdc42.1, siCdc42.2) (G). LB1319-MEL cells were treated or not with a Ras inhibitor, FTS, 50–100 µM for 24 h (H,I).

MICA membrane expression was analyzed by flow cytometry 72 h after transfection or 24 h after treatment. Representative illustrations of untreated cells (black) and of treated cells (filled in gray) with Tat-C3 exoenzyme (A) or FTS (H) are shown. To evaluate membrane antigen expression, the index of specific fluorescence (ISF) was calculated as indicated in the Section “Materials and Methods.” Results are expressed as mean  $\pm$  SD (error bars,  $n=3$  experiments). \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  versus control condition using the Student *t*-test (B) or the Tukey ANOVA test (C–I).

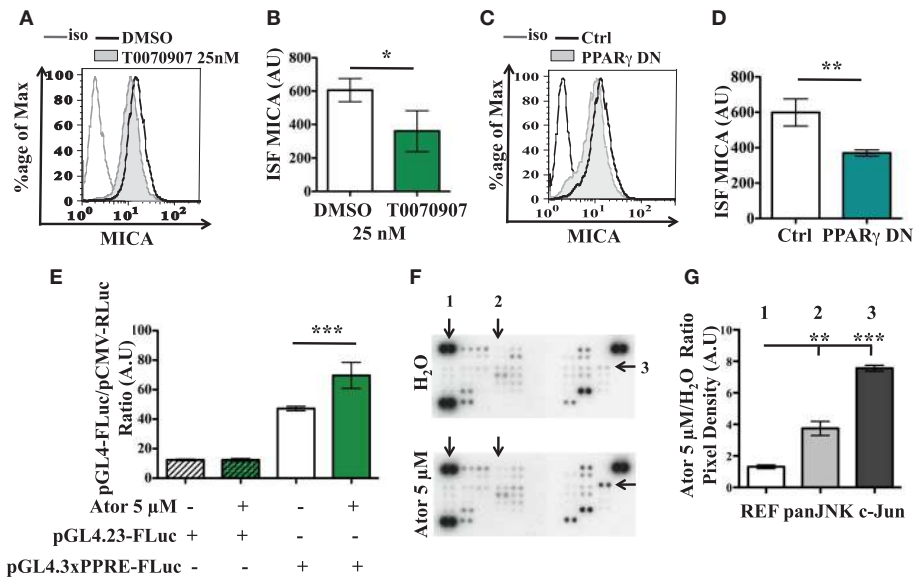
obtained results, illustrated in Figures 4E,G, show that atorvastatin treatment enhanced phosphorylations of c-Jun N-terminal kinases (JKN, spot 2 in Figures 4E,G) and especially the c-Jun kinase on Serine 63 (c-Jun, spot 3 in Figures 4E,G). Atorvastatin could therefore increase MICA expression via the Stress Activated Protein Kinase/JNK (SAPK/JNK) pathway, as previously described in human kidney endothelial cells (Holmen et al., 2007).

Altogether, these results show that PPAR $\gamma$  and SAPK/JNK pathways are involved in the atorvastatin-induced MICA overexpression.

## DISCUSSION

Melanomas are immunogenic tumors, which express tumor antigens and other molecules recognized by the effectors of innate and

adaptive immune responses. The current metastatic melanoma immunotherapies have limited efficiency (Robert et al., 2011; Brahmer et al., 2012). Therefore, new molecules to enhance the immune response are still needed. Statins are well known for their hypocholesterolemic effect, but retrospective studies have shown that statins also have a protective effect against melanoma development (Jacobs et al., 2011). We previously showed that inhibitors of the mevalonate pathway, notably statins, favored an anti-melanoma adaptive immune response (Tilkin-Mariame et al., 2005; Sarabayrouse et al., 2007, 2010). Here, we tested the ability of statins to enhance the NK-dependent innate immune response against human melanomas, particularly because these innate immune responses are essential for the control of metastases (Mehlen and Puisieux, 2006).



**FIGURE 4 | PPAR $\gamma$  and SAPK/JNK are involved in atorvastatin-induced MICA overexpression.** LB1319-MEL cells were treated with DMSO or a PPAR $\gamma$  inhibitor, T0070907 25 nM for 24 h (A,B). LB1319-MEL cells were transfected with an empty plasmid (Ctrl) or a plasmid encoding a PPAR $\gamma$  dominant negative mutant (PPAR $\gamma$  DN) (C,D). MICA membrane expression was analyzed 24 h after treatment or transfection. Representative illustrations of controlled cells (black) and treated cells (filled in gray) with T0070907 (A) or PPAR $\gamma$  DN (C) are shown. The ISF were calculated (B,D). LB1319-MEL cells were transfected with Firefly Luc control plasmids (pGL4.23-FLuc) or plasmid reporting the PPAR $\gamma$  PPRE activity (pGL4.3xPPRE-FLuc) and these cells were untreated (H<sub>2</sub>O) or treated

with atorvastatin 5  $\mu$ M (Ator 5  $\mu$ M). Twenty-four hours later, luciferase assays were performed (E). LB1319-MEL cells were untreated (H<sub>2</sub>O) or treated with atorvastatin 5  $\mu$ M for 48 h and a Proteome Profiler Array was performed to compare kinases phosphorylation (F,G). One, two, and three correspond respectively to a reference spot (REF), panJNK T182/Y185, T221/Y223 (panJNK), and c-Jun S63 (c-Jun) phosphorylations (F). The densities of the signals were analyzed with ImageJ software and the ratios of atorvastatin on untreated conditions were calculated (G). Results are expressed as mean  $\pm$  SD (error bars,  $n = 3$  experiments). \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  versus control condition using the Student  $t$ -test (B,D) or the Tukey ANOVA test (E,G).

In two human melanoma cell lines, we showed that statin treatments were not toxic at the doses used and that they weakly and reproducibly upregulated MICA expression, which is a critical target for anti-tumor NK cells. Interestingly, this weak MICA overexpression was able to enhance melanoma cell sensitivity to NK cell lysis *in vitro*. Similarly, Zhang et al. (2009) showed that sodium butyrate treatment of HeLa and HepG2 cells induced a weak but significant MICA overexpression allowing NK cells induced-death enhancement. Furthermore as previously described using hydralazine and valproate treatment on epithelial cancer cell lines (Chavez-Blanco et al., 2011), our treatment of melanoma cells with statins induced MICA membrane overexpression without increasing the level of soluble MICA avoiding tumor-induced suppression of NK cytotoxicity against the tumor. Moreover, the efficacy of this statin-induced MICA overexpression was quite obvious in our *in vivo* experiments performed in nude mice. The innate immune response of nude mice could be tested against human melanoma cells because these mice have NK cells bearing NKG2D receptors, which are able to recognize human antigens, like MICA (Cerwenka and Lanier, 2001; Fuertes et al., 2008). *In vivo* experiments showed that melanoma tumor growth, induced by subcutaneous injections of statin-pretreated melanoma cells, was strongly decreased compared to the tumors induced by untreated melanoma cells. Furthermore two mice out of six completely rejected atorvastatin

pretreated tumor cells. Most importantly, statin pretreatment also induced a significant decrease in melanoma metastatic lung implantation and a highly significant modification and decrease of the neoangiogenesis of these lungs. These modifications were detected by IntegriSense fluorescence, which recognize  $\alpha v \beta 3$  integrins overexpressed in the lungs during cancer cells colonization (Kimura et al., 2009; Mery et al., 2011; He et al., 2012; Valdivia et al., 2012). *In vitro* tumor migration is not affected by atorvastatin treatment (Figures A2D,E in Appendix) therefore NK-killing of MICA overexpressing melanoma cells seem to be determinant for the reduction of melanoma development *in vivo*, as suggested by the differences of tumor growth between MICA negative (LB583-MEL and LB2033-MEL), MICA-low (untreated LB1319-MEL), and MICA-higher (atorvastatin-treated LB1319-MEL) melanoma cells.

These *in vivo* experiments could not be reproduced with the BB74-MEL model because these cells did not form tumors in nude mice. Two hypotheses could explain these results. The first is that the *in vitro* proliferation rate of BB74-MEL cells (Figure A1D in Appendix) is too slow compared to LB1319-MEL cells (Figure 1E). As we followed the *in vivo* tumor growth of both cell lines for the same amount of time, the BB74-MEL cells may not have had enough time to form tumors. The second possible explanation is that BB74-MEL cells could be rejected at once by the NK cells



of the nude mice, because BB74-MEL cells express more MICA than LB1319-MEL cells (Figure A4C in Appendix) and do not express MHC class I molecules, which inhibit NK cells activity (Figure A4D in Appendix).

In an effort to determine the mechanism of action of this statin-induced MICA overexpression, we came to the unexpected conclusion that it is not induced by members of the Ras superfamily. Experiments done with bacterial, biochemical inhibitors, or siRNAs specific for Ras and Rho GTPases could not phenocopy statin-induced MICA overexpression. However, two other statin-altered pathways (Holmen et al., 2007; Balakumar and Mahadevan, 2012) seem to be involved, namely PPAR $\gamma$  and SAPK/JNK. Inhibitors of PPAR $\gamma$  factor induced a weak downregulation of MICA expression, while treatment with atorvastatin increased the activity of a synthetic promoter containing PPREs. Similarly, atorvastatin treatment also resulted in increased phosphorylation of JNK and c-Jun. The respective roles of signaling pathways involving PPAR $\gamma$  and SAPK/JNK in melanoma development and in MICA expression are still unknown and should be analyzed in further studies.

In previous works, we showed that inhibitors of the Rho GTPases favored adaptive anti-melanoma immune response (Tilkin-Mariame et al., 2005; Sarrabayrouse et al., 2007, 2010). In the present paper, we demonstrate that statins have another beneficial role in modifying melanoma cells, which is to render them more sensitive to the NK-killing. These results reinforce the idea that statins could be effective drugs for an immuno-based therapy of melanoma, by favoring adaptive and innate responses as well as reducing the metastatic process.

## MATERIALS AND METHODS

### TUMOR CELL LINES AND ANIMALS

The human melanoma cell lines LB1319-MEL, BB74-MEL, LB2033-MEL, and LB583-MEL were kindly provided by Pr. T. Boon (Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels). They were maintained in culture by serial passages in culture medium composed of RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% FCS, 1 mM glutamine, 1% penicillin-streptomycin-amphotericinB (Lonza), and they were monthly tested to be mycoplasma-free. Six- to nine-week-old female NMRI nude mice were obtained from Elevages Janvier. The experiments in mice have been done in the appropriate conditions of husbandry, experimentation and care, controlled by the Ethic Comity of the Institut Claudius Regaud under the control of the Regional Comity of Midi-Pyrénées (France). Our protocols were validated and received the agreement number ICR-2009-0011.

### TREATMENT OF MELANOMA CELLS

Melanoma cells were treated with a synthetic statin: atorvastatin (Pfizer) at different doses from 0.3 to 10  $\mu$ M for 24 or 48 h, or a natural statin: lovastatin (Calbiochem) at 1, 5, or 10  $\mu$ M for 48 h, or a RhoA, B, and C inhibitor: Tat-C3 exoenzyme (produced in our laboratory) (Sarrabayrouse et al., 2007) at 10  $\mu$ g/mL for 24 h, or with a Ras inhibitor: S-FarneylThioSialicylic acid (Interchim) at increasing concentrations from 50 to 100  $\mu$ M for 24 h, or a PPAR $\gamma$  inhibitor: T0070907 (Calbiochem) at 25 nM for 24 h. Untreated cells correspond to cells treated with equivalent volume of H<sub>2</sub>O

for atorvastatin, Ethanol (EtOH) for lovastatin, NaCl for Tat-C3 exoenzyme, DMSO for FTS and T0070907.

### TRANSFECTION OF siRNAs OR PLASMIDS

Melanoma cells were transiently transfected with siRNAs as previously described (Sarrabayrouse et al., 2007). Briefly,  $5 \times 10^5$  cells were transfected with 20 nM of siRNAs using Oligofectamine (Invitrogen). The siRNA duplexes were purchased from Eurogentec: non-targeting siControl (siCtrl; GACGUGGGACUG-AAGGGGU-TT), siRhoA1 (GAAGUCAAGCAUUCUGUC-TT), siRhoA2 (GCAGUAGAGUUGGCCUUUG-TT), siRhoB1 (CUAUGUGGGCCGACAUUGAG-TT), siRhoB2 (CCGUCUUCGAGAA-CUAUGU-TT), siRhoC1 (UAAGAAGGACCUGAGGCAA-TT), siRhoC2 (GACUAUGAUCGACUGCGC-TT), siRac1.1 (CACCAC-UGUCCCAACACUC-TT), siRac1.2 (AAGGAGAUUGGUGC-UGUAA-TT), siCdc42.1 (GAUAACUCACCACUGUCCA-TT), siCdc42.2 (GACUCCUUUCUUGCUUGUU-TT).

Melanoma cells were transiently transfected with a plasmid encoding PPAR $\gamma$  dominant negative proteins. Briefly,  $5 \times 10^5$  cells were transfected with 500 ng of plasmids with JetPrime (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

### FLOW CYTOMETRY ANALYSES

Melanoma cells ( $1 \times 10^6$ ) were stained with PE-conjugated anti-MICA mAb and isotype control purchased from R&D Systems. After 1 h incubation the stained cells were analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson) and the results were analyzed with FlowJo software (Tree Star). To evaluate membrane antigen expression on several independent experiments, the index of specific fluorescence (ISF) was determined. This was calculated using the following formula:

$$\frac{(\text{Median Fluorescence Intensity MFI with specific antibody} - \text{MFI with isotype control}) \times 100}{\text{MFI with isotype control}} \quad (1)$$

### WESTERN BLOT ANALYSES

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% NP-40, 1% proteases, and phosphatases inhibitors cocktails) and protein extracts were prepared by the standard procedure and then separated (50–200  $\mu$ g protein/lane) on SDS-PAGE gels. Proteins were blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. The filters were incubated at 4°C overnight with primary antibodies against MICA (R&D Systems). Actin was used as a loading control (Chemicon). The membranes (Hybond-p, Amersham Biosciences) were then incubated with HRP-labeled secondary antibody (Immunotech) for 1 h at room temperature (RT) and then detected by chemiluminescence detection kit (ECL, Pierce). Band intensities were quantified using ImageJ software (National Institute of Health).

### ELISA ASSAY

ELISA assays were performed using MICA DuoSet ELISA (R&D Systems). Briefly, capture antibodies were coated onto 96-wells plates overnight. Wells were washed and incubated with blocking reagent for 1 h at RT. One hundred microliters of the supernatants to be tested were added in triplicate for 2 h and detection antibody (in 2% goat serum; Lonza) was next incubated for 2 h at RT.

One hundred microliters of Streptavidin-HRP were incubated for 20 min in the dark at RT and the reaction was revealed by TBM (Thermo-Scientific) after 20 min in the dark at RT. The reaction was stopped by addition of sulfuric acid 1 N. Optical density was measured on a Labtech spectrophotometer at 450 nm.

### NK CELLS ISOLATION

NK cells isolations were performed using CD49b (DX5) MicroBeads (Miltenyi Biotec). Briefly, lymphocytes were isolated from three C57BL/6 spleens. Lymphocytes were then labeled with CD49b antibody coated with magnetic MicroBeads and applied onto a column placed on a magnetic support. The column was washed and unlabeled cells were collected. The CD49b-labeled NK cells were collected with PBS after the column removal from the magnetic support. NK cells purification was evaluated using FITC-conjugated CD49b antibody (>90%).

### ANALYSIS OF NK CELLS CYTOTOXIC ACTIVITY

We used CytoxiLix kit (Onco-immumin, Interchim) to investigate NK cells cytotoxic activity by flow cytometry. Briefly  $1 \times 10^6$  LB1319-MEL cells pretreated either with H<sub>2</sub>O or 5  $\mu$ M atorvastatin for 48 h were stained with targets marker TFL-4 (FL-4) for 20 min at 37°C and then washed with PBS. Stained target cells were then diluted at  $8 \times 10^4$  cells per 100  $\mu$ L of culture medium. The effector NK cells (E) were incubated with the stained target cells (T) for 1 h at 37°C at 5:1 E/T ratio in 96-well plates (Dutscher) in triplicate. Supernatant of each well was then discarded and 75  $\mu$ L of caspase substrate, which is FITC fluorescent when cleaved (FL-1) or 75  $\mu$ L of Wash Buffer for control conditions were added. Cells were finally washed with Wash Buffer and resuspended in PBS for analysis on a FACSCalibur. The percentage of cytotoxicity was calculated as the percentage of dead target cells, stained both green (FL-1+) and blue (FL-4+), among the total number of target cells (all FL-4+ cells).

### SUBCUTANEOUS TUMOR GROWTH

To study the tumor growth, NMRI nude mice were injected subcutaneously (s.c.) with  $5 \times 10^6$  LB1319-MEL cells or  $2 \times 10^6$  LB2033-MEL or LB583-MEL cells either untreated or pretreated with 5  $\mu$ M atorvastatin for 48 h. The melanoma cells were washed thrice in PBS before the injections to completely eliminate the statin. Animals were monitored for tumor growth every 2–3 days by palpation and diameters of the tumors were measured using a Vernier caliper. Tumor-bearing animals were sacrificed at day 15 or 22 after tumor injection. At this time no mice were died and the tumors did not display severe ulceration or reached a size of 300 mm<sup>2</sup>. For the mice that had rejected the tumor cells, experiments were terminated 9 weeks after tumor implantation. Two groups of three mice were tested and the experiments were done twice. Results are expressed as surface  $\pm$ SD (error bars,  $n = 6$  mice). Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA test.

### PULMONARY METASTASES IMPLANTATION

To study pulmonary metastases implantation, NMRI nude mice were injected i.v. with  $1 \times 10^6$  LB1319-MEL cells either untreated or pretreated 48 h with 5  $\mu$ M atorvastatin. The melanoma cells were washed thrice in PBS before the injections to completely

eliminate the statin. These i.v. injections in the tail vein of melanoma cells followed by lungs examination for tumor colonization allows controlled and quantitative experimentation of the last step of metastasis: the organ colonization. Mice were sacrificed 16 days later, at this time no mice were died. Mice were i.v. injected with 100  $\mu$ L of IntegriSense (Perkin-Elmer) 30 h before sacrifice. The fluorescence in the lungs was analyzed by Fluobeam® camera (690–700 nm) for 120 ms exposition and the fluorescent signals were quantified using ImageJ software (National Institute of Health). The experiments included three or four mice/group and were done twice.

### IN VITRO ASSAYS FOR CELL MIGRATION

The migration assay was performed with 8- $\mu$ m pore size transwell system (BD Biosciences). Cells ( $1 \times 10^4$ /well) were added with serum-free medium in the upper compartment of the filter. The bottom chamber was filled with complete medium. After 24 h, cells on the bottom surface of the filter were stained and counted under an Eclipse Ti microscope (Nikon Instruments; objective 20 $\times$ ) and a CoolSNAP HQ2 camera (Photometrics) in three randomized fields of 505 mm<sup>2</sup>.

### LUCIFERASE ASSAYS

The reporter vector for PPAR $\gamma$ , pGL4.3xPPRE-FLuc plasmid containing PPRE sequences, was homemade constructed from the pB3xPPRE-Luc in an empty vector pGL4.23-FLuc (Rauwel et al., 2010) expressing Firefly Luciferase (FLuc). The pGL4.3xPPRE and the pGL4.23 were transfected using JetPrime (Invitrogen). The pCMV-RLuc plasmid expressing Renilla Luciferase (RLuc) was co-transfected as an internal control. Briefly,  $3 \times 10^4$  cells were transfected with the reporter vectors as described above. Four hours after, transfection was stopped by removing the medium and cells were treated with H<sub>2</sub>O or atorvastatin. Twenty-four hours later, luciferase activities were measured using the Dual Luciferase Assay System (Promega).

### REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

Total RNA of LB1319-MEL cells untreated and treated with atorvastatin 5 or 10  $\mu$ M for 24 h were isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen) combined with the RNase-Free DNase set (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, then reverse-transcribed using the iScript cDNA synthesis kit (BioRad). Quantitative real-time PCR was performed with a CFX96 Touch Real-Time PCR detection system (BioRad) using iQ SYBR Green Supermix (BioRad). We used  $\beta$ -actin as a housekeeping gene. Primers sequences were: CPT1A forward 5'TCG-ATT-TTC-AAG-GGT-CTT-CG3', CPT1A reverse 5'CAC-AAC-GAT-CAG-CAA-ACT-GG3',  $\beta$ -actin forward 5'TCC-CTG-GAG-AAG-AGC-TAC-GA3',  $\beta$ -actin reverse 5'-AAG-GAA-GGC-TGG-AAG-AG3'. The relative fold change was calculated using the following formula:  $2^{-((Ct\ CPT1A - Ct\ \beta\text{-actin})\ \text{treated cells}) / ((Ct\ CPT1A - Ct\ \beta\text{-actin})\ \text{untreated cells})}$ .

### PROTEOME PROFILER ARRAY

Proteome Profiler Arrays were performed using Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D Systems). Briefly,  $5 \times 10^5$  LB1319-MEL cells, either untreated (H<sub>2</sub>O) or treated with 5  $\mu$ M atorvastatin, were lysed in the Lysis buffer. Supernatants were incubated on the blocked membranes overnight at 4°C. Membranes

were washed and incubated with detection antibodies cocktails for 2 h at RT. Membranes were washed and incubated with 1 mL of diluted Streptavidin-HRP for 30 min in the dark at RT. Then the phospho-kinases were detected using chemiluminescence detection. Spot intensities were quantified using ImageJ software (National Institute of Health).

## REFERENCES

- Balakumar, P., and Mahadevan, N. (2012). Interplay between statins and PPARs in improving cardiovascular outcomes: a double-edged sword? *Br. J. Pharmacol.* 165, 373–379.
- Berman, D., Parker, S. M., Siegel, J., Chasalow, S. D., Weber, J., Galbraith, S., et al. (2010). Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 by ipilimumab results in dysregulation of gastrointestinal immunity in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol.* 10, 11.
- Boudreau, D. M., Yu, O., and Johnson, J. (2010). Statin use and cancer risk: a comprehensive review. *Expert Opin. Drug Saf.* 9, 603–621.
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2455–2465.
- Cerwenka, A., and Lanier, L. L. (2001). Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol. Rev.* 181, 158–169.
- Chavez-Blanco, A., De la Cruz-Hernandez, E., Dominguez, G. I., Rodriguez-Cortez, O., Alatorre, B., Perez-Cardenas, E., et al. (2011). Upregulation of NKG2D ligands and enhanced natural killer cell cytotoxicity by hydralazine and valproate. *Int. J. Oncol.* 39, 1491–1499.
- Flaherty, K. T., Puzanov, I., Kim, K. B., Ribas, A., McArthur, G. A., Sosman, J. A., et al. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 809–819.
- Fuertes, M. B., Girart, M. V., Molinero, L. L., Domaica, C. I., Rossi, L. E., Barrio, M. M., et al. (2008). Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 180, 4606–4614.
- Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., et al. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28, 571–580.
- He, T., Xue, Z., Lu, K. M., Valdivia, Y. A. M., Wong, K. K., Xie, W., et al. (2012). A minimally invasive multimodality image-guided (MIMIG) system for peripheral lung cancer intervention and diagnosis. *Comput. Med. Imaging Graph* 36, 345–355.
- Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.
- Heinaniemi, M., Uski, J. O., Degenhardt, T., and Carlberg, C. (2007). Meta-analysis of primary target genes of peroxisome proliferator-activated receptors. *Genome Biol.* 8, R147.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723.
- Holmen, C., Elsheikh, E., Christensson, M., Liu, J., Johansson, A. S., Qureshi, A. R., et al. (2007). Anti endothelial cell autoantibodies selectively activate SAPK/JNK signalling in Wegener's granulomatosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2497–2508.
- Jacobs, E. J., Newton, C. C., Thun, M. J., and Gapstur, S. M. (2011). Long-term use of cholesterol-lowering drugs and cancer incidence in a large United States cohort. *Cancer Res.* 71, 1763–1771.
- Kimura, R. H., Cheng, Z., Gambhir, S. S., and Cochran, J. R. (2009). Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. *Cancer Res.* 69, 2435–2442.
- Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 9, 495–502.
- Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer* 6, 449–458.
- Mery, E., Jouve, E., Guillermet, S., Bourgognon, M., Castells, M., Golzio, M., et al. (2011). Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study. *Gynecol. Oncol.* 122, 155–162.
- Meyer, S., Vogt, T., Landthaler, M., Berand, A., Reichle, A., Bataille, F., et al. (2009). Cyclooxygenase 2 (COX2) and peroxisome proliferator-activated receptor

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pr. T. Boon for providing the human melanoma cell lines and Dr. S. Chavanas for the dominant negative mutant and the inhibitor of PPAR $\gamma$ . This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale INSERM and by the Institut Claudius Regaud ICR.

- gamma (PPAR $\gamma$ ) are stage-dependent prognostic markers of malignant melanoma. *PPAR Res.* 2009, 848645.
- Peters, J. M., Shah, Y. M., and Gonzalez, F. J. (2012). The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat. Rev. Cancer* 12, 181–195.
- Rauwel, B., Mariame, B., Martin, H., Nielsen, R., Allart, S., Pipy, B., et al. (2010). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *J. Virol.* 84, 2946–2954.
- Rikitake, Y., and Hirata, K. (2009). Inhibition of RhoA or Rac1? Mechanism of cholesterol-independent beneficial effects of statins. *Circ. J.* 73, 231–232.
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., et al. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364, 2517–2526.
- Sarrabayrouse, G., Pich, C., Moriez, R., Armand-Labit, V., Rochoaix, P., Favre, G., et al. (2010). Melanoma cells treated with GGTI and IFN-gamma allow murine vaccination and enhance cytotoxic response against human melanoma cells. *PLoS ONE* 5:e9043. doi:10.1371/journal.pone.0009043
- Sarrabayrouse, G., Synaev, C., Leveque, K., Favre, G., and Tilkin-Mariame, A. F. (2007). Statins stimulate in vitro membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells. *Neoplasia* 9, 1078–1090.
- Sharma, S., Sun, X., Rafikov, R., Kumar, S., Hou, Y., Oishi, P. E., et al. (2012). PPAR-gamma regulates carnitine homeostasis and mitochondrial function in a lamb model of increased pulmonary blood flow. *PLoS ONE* 7:e41555. doi:10.1371/journal.pone.0041555
- Szatmari, I., Torocsik, D., Agostini, M., Nagy, T., Gurnell, M., Barta, E., et al. (2007). PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood* 110, 3271–3280.
- Tilkin-Mariame, A. F., Cormary, C., Ferro, N., Sarrabayrouse, G., Lajoie-Mazenc, I., Faye, J. C., et al. (2005). Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. *FASEB J.* 19, 1513–1515.
- Valdivia, Y. A. M., Wong, K., He, T. C., Xue, Z., and Wong, S. T. (2012). Image-guided fiberoptic molecular imaging in a VX2 rabbit lung tumor model. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 22, 1758–1764.
- Weeraratra, A. T. (2012). RAF around the edges – the paradox of BRAF inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 366, 271–273.
- Zhang, C., Wang, Y., Zhou, Z., Zhang, J., and Tian, Z. (2009). Sodium butyrate upregulates expression of NKG2D ligand MICA/B in HeLa and HepG2 cell lines and increases their susceptibility to NK lysis. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1275–1285.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

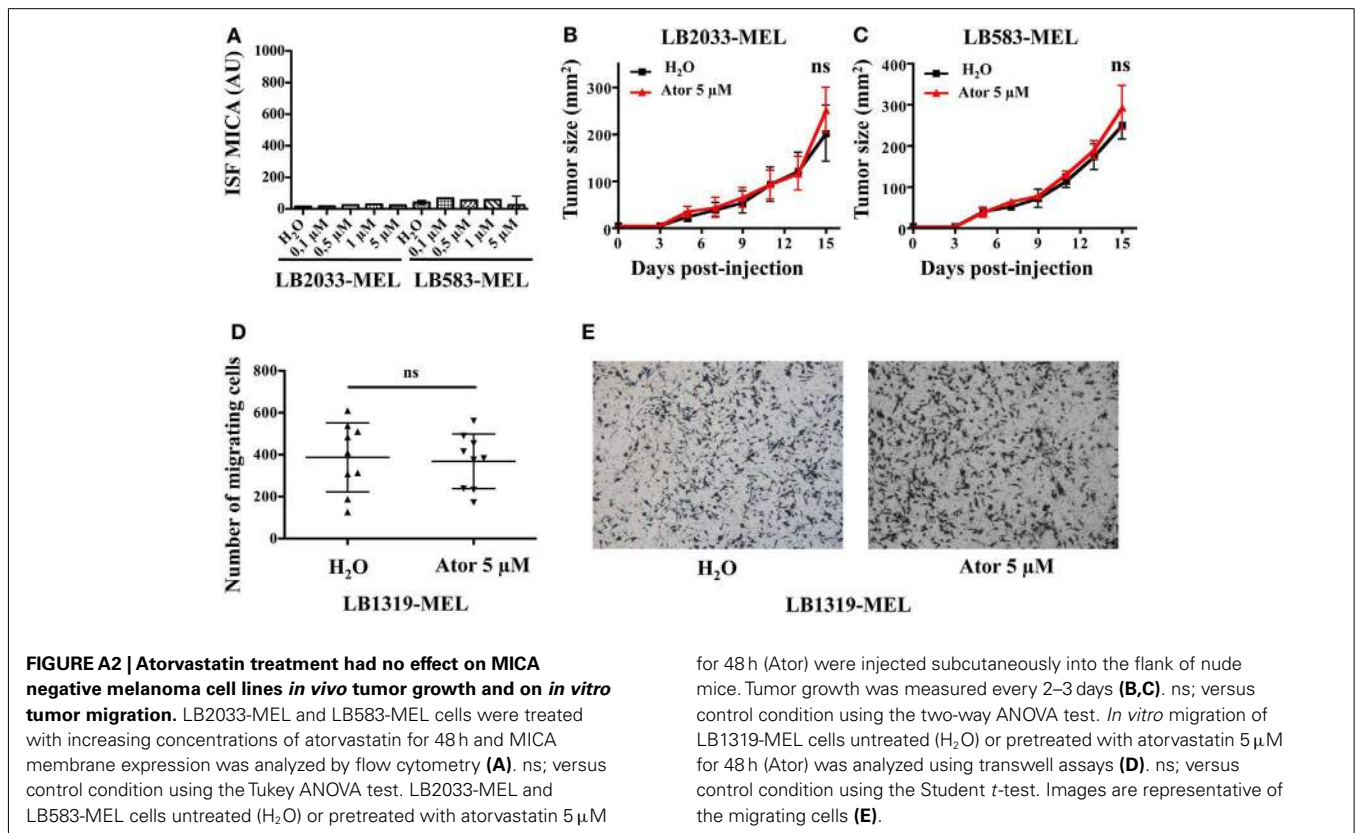
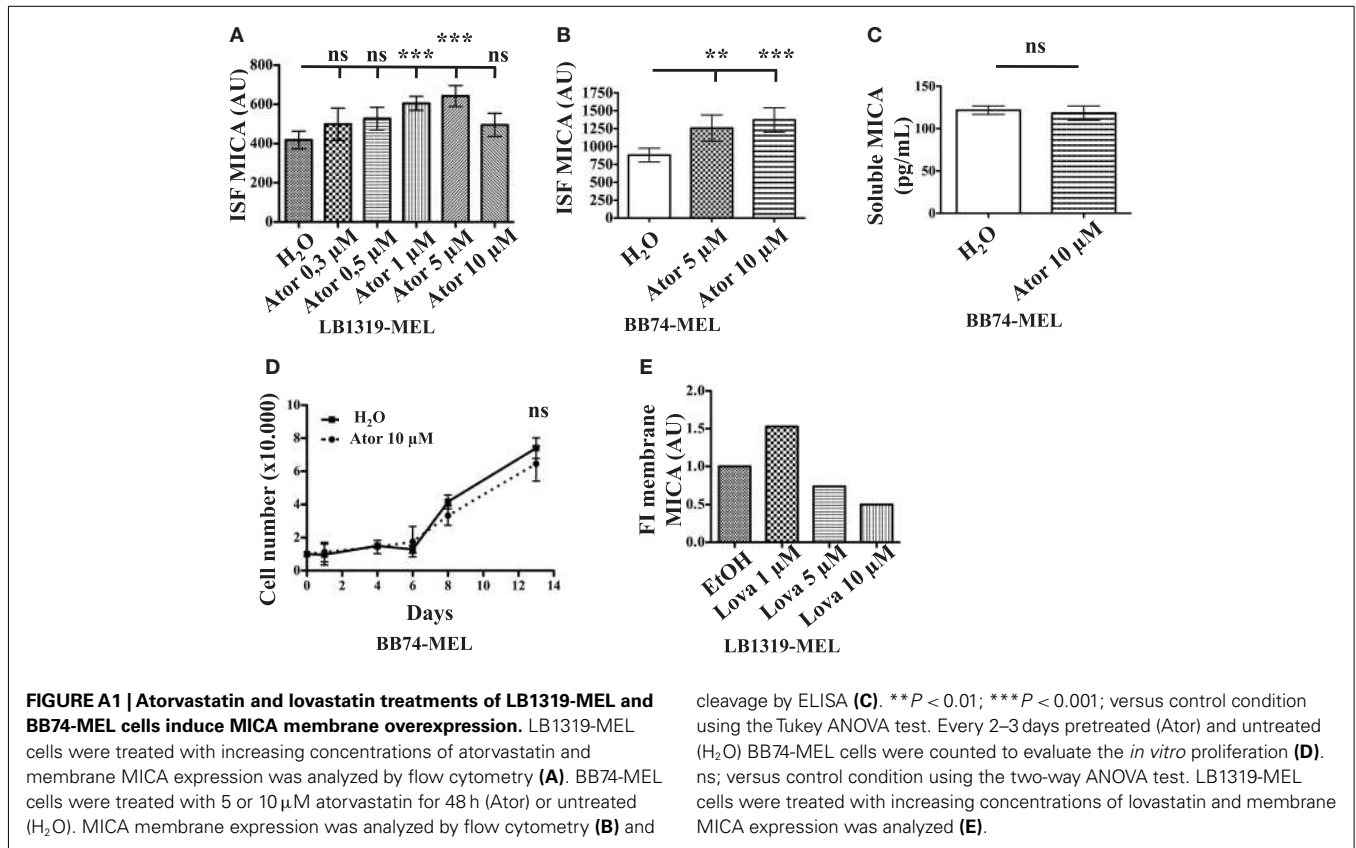
Received: 18 December 2012; accepted: 27 February 2013; published online: 13 March 2013.

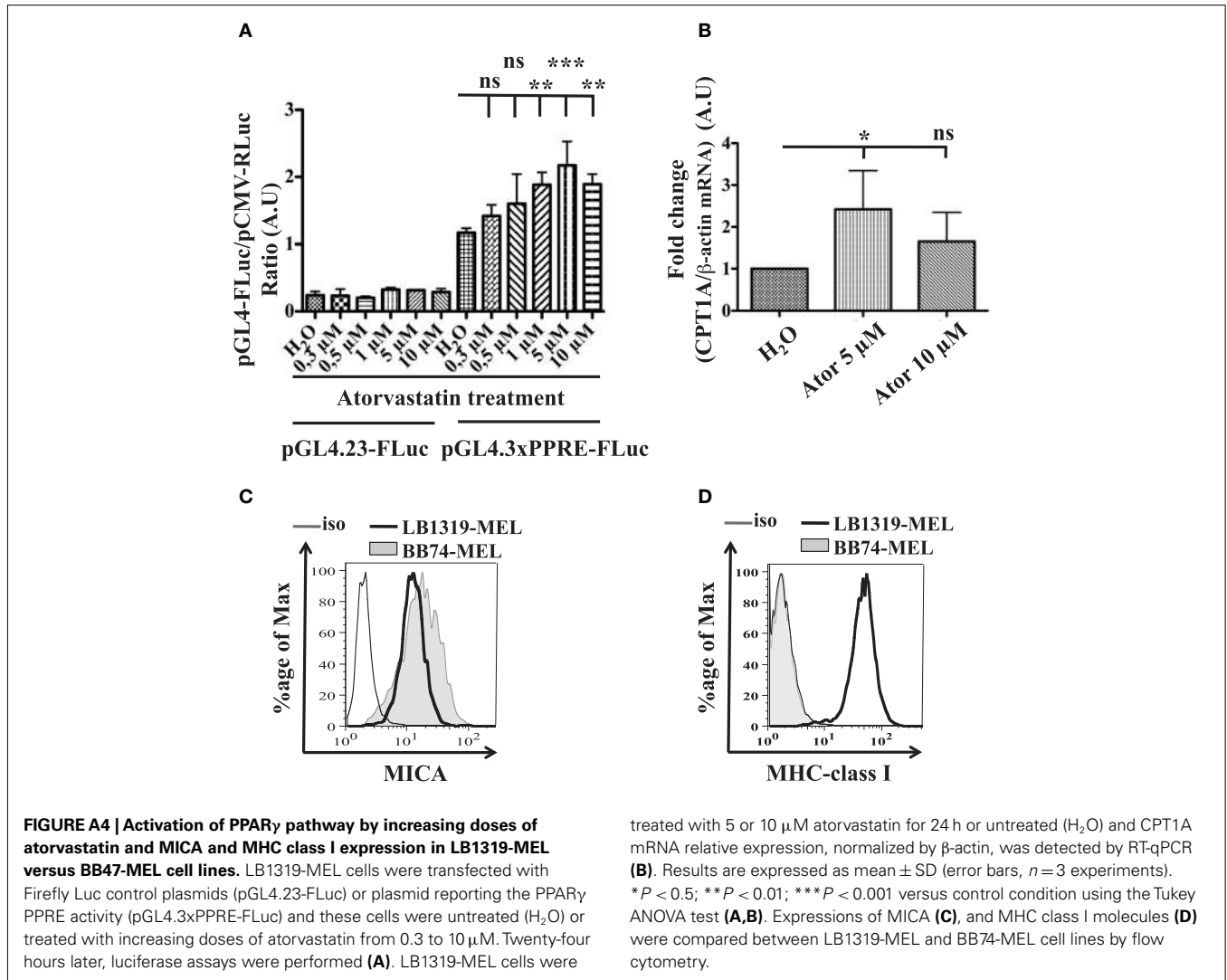
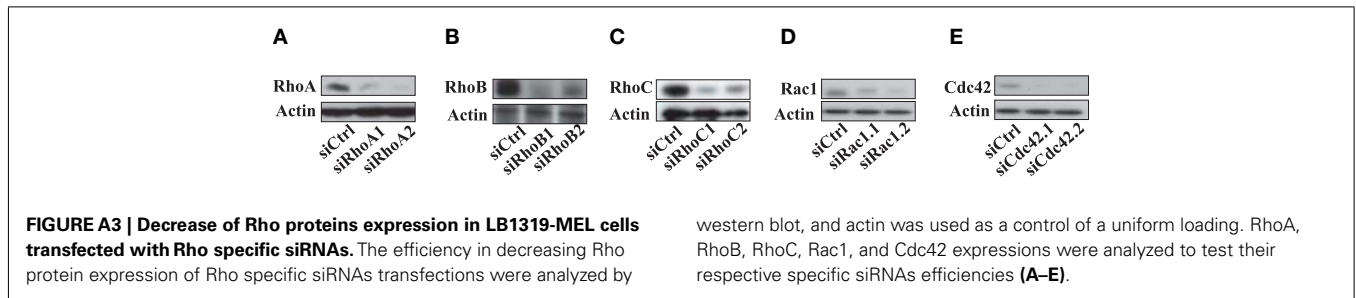
Citation: Pich C, Teiti I, Rochoaix P, Mariamé B, Couderc B, Favre G and Tilkin-Mariamé A-F (2013) Statins reduce melanoma development and metastasis through MICA overexpression. *Front. Immunol.* 4:62. doi:10.3389/fimmu.2013.00062

This article was submitted to *Frontiers in Tumor Immunity, a specialty of Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2013 Pich, Teiti, Rochoaix, Mariamé, Couderc, Favre and Tilkin-Mariamé. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

APPENDIX









## Résultats II

### ***In vivo* Atorvastatin-induced inhibition of human melanoma development**

**Iotefa Teiti**, Christine Pich, Guillaume Sarrabayrouse, Gilles Favre, Véronique Maisongrosse, Philippe Roचाix, and Anne-Françoise Tilkin-Mariamé

#### **Article en préparation**

Le mélanome est un cancer en progression dont les thérapies classiques s'avèrent peu efficace dans les stades métastatiques avancés de la maladie (Eggermont et al, 2013). Les mélanomes sont connus pour exprimer des antigènes tumoraux, mais les réponses immunes des patients ne semblent pas assez puissantes pour contrôler la maladie (Parmiani & Maccalli, 2012). C'est pourquoi de nouvelles stratégies s'orientent vers l'immunothérapie notamment en recherchant de nouvelles méthodes pour amplifier les réponses immunes en inhibant leur volet inhibiteur (Kim et al, 2014).

Ces réponses immunes s'effectuent essentiellement en deux étapes successives : la réponse innée puis la réponse adaptative (Dranoff, 2004). Le volet inné de la réponse immunitaire est notamment pris en charge par les cellules NK qui sont capables de lyser les cellules tumorales (Cruvinel Wde et al, 2010). Cette activité cytotoxique anti tumorale est majoritairement contrôlée par le récepteur activateur NKG2D exprimé sur les cellules NK (Zafirova et al, 2011). En effet, des souris déficientes en NKG2D sont d'avantage prédisposées à développer divers cancers et à en mourir précocement (Guerra et al, 2008). Ce récepteur reconnaît plusieurs ligands dont le plus connu est la protéine MICA qui peut être régulée aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel.

Les statines sont des inhibiteurs pharmacologiques pléiotropes de la HMG-CoA réductase qui bloquent la synthèse du mévalonate. Puisque l'activité des GTPases Ras et Rho dépend des dérivés métaboliques du mévalonate, les statines inhibent aussi leurs activités (Vega & Ridley, 2008). Les statines sont des agents hypocholestérolémiant largement utilisés dans les thérapies cardiovasculaires et cérébrovasculaires (Martin et al, 2014). Des études rétrospectives montrent que les statines ont des effets protecteurs contre différents cancers dont le mélanome (Demierre, 2005; Yeganeh et al, 2014). Nous avons voulu savoir si des inhibiteurs de la voie du mévalonate pourraient favoriser une réponse innée participant au rejet immun des mélanomes.

Des travaux précédents de l'équipe ont montré que des statines induisent une surexpression membranaire de MICA sur les lignées de mélanome humain LB1319-MEL et BB74-MEL. Ainsi, ces cellules tumorales sont sensibilisées à la lyse cellulaire réalisée par les cellules NK et cela réduit le développement tumoral *in vivo*.

Dans la nouvelle étude présentée ci-après, nous avons entrepris des expériences similaires sur une autre lignée de mélanome : les cellules WM-266-4 qui sont capables de former des métastases pulmonaires après injections intraveineuses (i.v.) en souris Nude. Les premières expériences *in vitro*

ont permis de montrer que le traitement des cellules WM-266-4 avec de l'Atorvastatine induit aussi une surexpression membranaire du ligand MICA, et que les doses optimales d'Atorvastatine nécessaires pour induire cette surexpression sont de 0,5 à 1  $\mu\text{M}$ . Ces traitements ne sont pas toxiques par eux-mêmes car la prolifération *in vitro* des cellules prétraitées n'est pas ralentie.

Ensuite, nous avons étudié l'impact du prétraitement *in vitro* des cellules WM-266-4 à l'Atorvastatine sur le développement *in vivo* des tumeurs. Pour cela ces cellules prétraitées ou non ont été injectées en sous cutané (s.c.) à des souris NMRI nu/nu. L'injection de ces cellules tumorales humaines en souris NMRI nu/nu permet d'étudier *in vivo* la réponse innée anti tumorale. En effet, MICA est un ligand humain, mais il possède une propriété unique, celle d'être reconnu et d'activer le récepteur NKG2D des cellules NK aussi bien humaines que murines. Ces injections s.c. des cellules WM-266-4 ont mis en évidence un ralentissement significatif de la croissance tumorale des cellules prétraitées à l'Atorvastatine.

Puisque les cellules NK jouent un rôle prépondérant dans le contrôle du processus métastatique du mélanome (Mehlen & Puisieux, 2006), nous avons étudié l'effet de l'Atorvastatine sur l'implantation métastatique dans les poumons des souris NMRI nu/nu. Les cellules WM-266-4 prétraitées ou non à l'Atorvastatine ont été injectées dans la veine caudale de souris NMRI nu/nu. Vingt jours après injection, les poumons sont récupérés et des coupes histologiques sont colorées à l'éosine-hémalun. La quantification microscopique a révélé une diminution du nombre des métastases pulmonaires suite aux injections i.v. des cellules prétraitées à l'Atorvastatine par rapport aux cellules non traitées.

Puisque les statines sont à l'heure actuelle des médicaments fréquemment prescrits dans le traitement des maladies cardiovasculaires et en vue d'applications ultérieures éventuelles en thérapie anti mélanome, nous avons entrepris s'étudier la capacité de l'Atorvastatine à induire directement *in vivo* un ralentissement de la croissance tumorale. Ainsi, en se basant sur les doses administrées en clinique, nous avons testé l'impact sur le développement tumoral d'injections intra péritonéales (i.p.) quotidiennes de 30  $\mu\text{g}$  d'Atorvastatine à des souris NMRI nu/nu injectées en s.c. avec les cellules WM-266-4. Les résultats montrent que les injections IP d'Atorvastatine réduisent la croissance des tumeurs WM-266-4 sous-cutanées.

Enfin, nous avons voulu déterminer le mécanisme d'action de l'Atorvastatine sur le contrôle du développement du mélanome WM-266-4. Nous avons pu montrer que les injections i.p. d'Atorvastatine induisent une production et une activation plus importante des cellules NK dans les rates des souris traitées. Ces résultats suggèrent que ces cellules NK pourraient infiltrer les tumeurs WM-266-4 et détruire des cellules tumorales.

L'ensemble de ce travail confirme que l'Atorvastatine induit d'une part une surexpression de MICA sur des cellules de mélanome, et d'autre part une activation des cellules NK *in vivo*. Ces deux mécanismes liés favorisent l'induction *in vivo* d'une réponse immune innée qui ralentirait le développement tumoral. L'Atorvastatine pourrait donc avoir un intérêt dans l'immunothérapie du mélanome.



# **Atorvastatin-induced inhibition of human melanoma *in vivo* development**

Teiti Iotefa<sup>1,2</sup>, Pich Christine<sup>1,2</sup>, Sarabayrouse Guillaume<sup>1,2</sup>, Filali Liza<sup>1,2</sup>, Favre Gilles<sup>1,2,3</sup>,  
Maisongrosse Véronique<sup>2</sup>, Rochaix Philippe<sup>2,3</sup>, and Tilkin-Mariamé Anne-Françoise<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Unité INSERM UMR 1037, CRCT, Toulouse F-31037, France

<sup>2</sup> Université Paul Sabatier, Toulouse F-31062, France

<sup>3</sup> Institut Universitaire du Cancer - IUCT, Toulouse F-31059, France

**Corresponding author:** Tilkin-Mariamé Anne-Françoise<sup>1,2</sup> INSERM U1037 - Université

Toulouse 3 - ERL5294 CNRS, 2 avenue Hubert Curien, 31037 TOULOUSE - FRANCE

E-mail: anne-francoise.tilkin@inserm.fr

***Running title: In vivo Atorvastatin-induced melanoma control***

**Keywords :** Statins, melanoma, metastasis, NKG2D, MHC class I Chain-related protein A (MICA).

The authors have no conflicting financial interests.

## ***Abstract***

Statins, 3-hydroxy 3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors, are pleiotropic pharmacological inhibitors, which block the mevalonate synthesis pathway. They are widely used as hypocholesterolemic agents and have shown protective effects against cancers.

Our previous data showed that statin treatment induced MHC class I chain-related protein A (MICA) membrane overexpression in human melanoma cells, which increased their sensitivity to NK cell cytotoxicity and thus the inhibition of tumor development. MICA is a ligand of the NK cell activating receptor NKG2D. This receptor is essential for NK cell control of tumor development and it has the unique property of being able to recognize tumor cells of both murine and human origin.

Here, using atorvastatin and the WM-266-4 melanoma cell line, we first confirmed that statin treatment enhances MICA membrane expression and decreases local tumor growth and pulmonary

metastasis implantation *in vivo*. Our data show that atorvastatin intraperitoneal injections favor an innate anti-melanoma immune response by two linked mechanisms: an inhibition of tumor growth following subcutaneous implantation of untreated WM-266-4 cells into NMRI nude mice, and an increase in splenic NK cell concentration and activation. This report confirms that statins could become effective pharmacological agents for melanoma immunotherapy.

## ***Introduction***

Despite tumor antigen expression in human melanoma cells and the mobilization of an immune response in patients, survival after metastasis detection is usually short [1]. During the oncogenic process, tumor cells must overcome inherent but also micro environmental control mechanisms, among which the innate and adaptive immune responses play a major role [2]. Interestingly, some pharmacological drugs such as statins render melanoma cells more immunogenic for the both the innate and adaptive anti-tumor immune responses [3,4,5]. We have previously shown that the *in vitro* treatment of human melanoma cells with atorvastatin or lovastatin enhanced tumor membrane expression of the MHC class I chain-related protein A (MICA), which is a ligand of the NKG2D activating receptor of NK cells [6,7,8]. This effect is important because NKG2D expression is essential for NK cell control of tumor development [9]. Interestingly NKG2D can recognize tumor cells of both murine and human origin [10]. This unique property allowed us to show that the statin-induced MICA membrane overexpression not only enhanced *in vitro* melanoma sensitivity to NK cell lysis but also decreased local tumor growth and pulmonary metastasis implantation in mice injected with statin-treated melanoma cells [7].

Statins are 3-hydroxy 3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors. They are pleiotropic pharmacological inhibitors, which block the mevalonate synthesis pathway and consequently Ras and Rho GTPase activity [11]. They also enhance Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) activity [12]. Statins are used by millions of people as hypocholesterolemic agents in cardiovascular and cerebrovascular diseases and retrospective studies have shown that they could also have protective effects on the development of cancers including melanomas [13,14,15]. In particular, *in vitro* atorvastatin treatment has been shown to revert the metastatic phenotype of human melanoma cells, including WM266-4 cells [16]. The inhibition of Rho GTPase activity is involved in the protective effects of statins. Indeed, RhoC overexpression has been shown to dramatically increase the *in vivo* melanoma metastatic potential, and atorvastatin treatment was shown to inhibit the colonization and formation of lung metastases of melanoma cells overexpressing RhoC [17]. Unexpectedly, our study describing statin-induced MICA overexpression showed that PPAR $\gamma$  is involved in this regulation and is independent of the Ras and Rho GTPase signaling pathways [7].

The statin-induced inhibition of melanoma development that we described using pretreated LB1319-MEL and BB74-MEL melanoma cell lines suggested that statins could be involved in new treatment

options for metastatic melanoma treatment. Here, similar results were obtained with another human melanoma cell line, WM-266-4. This cell line has also allowed us to better quantify pulmonary metastasis implantation from atorvastatin pretreated melanoma cells. But the major breakthrough is that this model has allowed us to test the efficacy of treatment with statins directly *in vivo*, since in order to be considered as really useful cancer drugs statins need demonstrate their ability to slow the growth of tumors derived from melanoma cells that have not been pretreated with statins. In the present study we analyzed the effect of repeated intraperitoneal statin injections on reducing the growth of untreated melanoma cells. Results show that subcutaneous tumors derived from untreated WM-266-4 melanoma cells in NMRI nu/nu mice were significantly reduced by atorvastatin injections. Furthermore, atorvastatin injections enhanced splenic activated NK cells. Therefore this report provides further evidence that statins could become interesting pharmacological agents for melanoma immunotherapy.

## ***Material and Methods***

### ***Tumor cell line and mice***

WM-266-4 human melanoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection and maintained in culture by serial passages in culture medium composed of RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS), 1mM glutamine, 1% penicillin-streptomycin-amphotericin B (Lonza) and it was monthly tested to be mycoplasma-free.

Six- to eight-week-old female NMRI nu/nu mice were used for all experiments described in this study. They were obtained from Elevages Janvier. All experiments involving mice were done using appropriate conditions of husbandry, experimentation and care, supervised by the Ethic Comity of the Institut Claudius Regaud Under the control of the Regional Comity of Midi-Pyrénées (France). Our protocol was validated and received the agreement numbers ICR-2009-0011 and ICR-2009-0020.

### ***In vitro treatment of melanoma cells***

WM-266-4 melanoma cells were either untreated (NT) or treated for 48h with growing doses (0,25; 0,5; 1; 3 and 5  $\mu$ M) of the synthetic statin: Atorvastatin (Pfizer).

### ***Flow cytometric analyses***

To detect membrane MICA expression,  $1 \times 10^6$  WM-266-4 cells were stained with PE-conjugated anti-MICA mAb and isotype control purchased from R&D Systems.  $1 \times 10^6$  splenocytes were stained to detected NK cells and activated NK cells with APC-conjugated NK1.1 mAb and PE-conjugated CD69 obtained from Beckton Dickinson Biosciences. Stained cells were analyzed on a BD FACS Calibur (BD) and results were analyzed with FlowJo software (tree Star).

### ***In vitro proliferation of untreated versus Atorvastatin pretreated tumor cells***

$1 \times 10^5$  WM-266-4 cells either untreated (NT) or pretreated for 48h with 1 or 5  $\mu\text{M}$  of Atorvastatin were cultivated *in vitro*. After Atorvastatin treatment and before culture WM-266-4 cells were washed thrice to completely eliminate the statin. The cells were counted after 2, 4, 6, 9 and 12 days of culture with Cell Counter (Coulter) to evaluate their *in vitro* proliferation, which allows evaluating the toxicity of Atorvastatin treatment.

### ***Subcutaneous tumor growth***

Two kind of experiments were done:

- The first one was performed to evaluate the impact of *in vitro* Atorvastatin pretreatment on local (subcutaneous) WM-266-4 melanoma tumor development. For this purpose NMRI nu/nu mice were injected subcutaneously (s.c.) with  $5 \times 10^5$  WM-266-4 cells either untreated or pretreated with 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin for 48h. These cells were washed thrice in PBS before the injections to completely eliminate the statin.
- The second one was performed to evaluate the impact of repeated intraperitoneal (IP) Atorvastatin injections on local (subcutaneous) WM-266-4 melanoma tumor development. For this purpose NMRI nu/nu mice were injected s.c. with  $5 \times 10^5$  untreated WM266-4 cells and every following day mice were IP injected with 0,1mL of PBS alone or with 30  $\mu\text{g}$  of Atorvastatin. This dose was chosen because it corresponds to the dose given to humans as hypocholesterolemic agents in cardiovascular and cerebrovascular diseases.

In both experiments mice were monitored for tumor growth every 2-3 days by palpation and tumor surfaces were measured using digital caliper. Tumor-bearing mice were sacrificed at day 18 or 20 after tumor injection. At this time no mice were died and the tumors did not display ulcerations. Two groups of 5 or 6 mice were tested and the experiments were done twice. Results are expressed as surface  $\pm$  SEM (error bars,  $n=11$  mice). Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA test.

### ***Pulmonary metastases implantation and detection***

NMRI nude mice were injected intravenously (i.v.) in the tail vein with  $5 \times 10^5$  WM-266-4 cells either untreated or pretreated 48h with 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin. Melanoma cells were washed thrice in PBS before the injections to completely eliminate the statin. Mice were sacrificed 20 days later; at this time no mice were died and behave normally. The lungs were fixed in formalin and paraffin embedded to visualize microscopic metastases. Lung metastases were quantified after immunohistochemical (IHC) staining by a pathologist and a biologist. These analyses were done independently and blind. The IHC staining was done with KBA.62 mAbs [18] ready to use from DAKO revealed by FLEX/HRP (20 min

incubation) then by FLEX DAB+ Sub-Chromo (10 min incubation) and FLEX Hematoxylin (5 min incubation). Photos were taken with a DMR microscope (Leica Microsystems) and a DS-Fi1 camera (Nikon Instruments). The experiments were done twice and included eight mice/group.

### ***Statistical analysis***

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Significance of flow cytometry analyses was assessed by t-test or Tukey one-way ANOVA test. All statistic tests were two-sides. The values are expressed as mean values  $\pm$  standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM) in the figures. P-values less than .05 were considered statistically significant.

## ***Results***

### ***Atorvastatin treatment of WM266-4 melanoma cells induces MICA overexpression in vitro***

Atorvastatin was chosen because of its favorable safety profiles relative to other drugs in its class [19] and because we found that mice tolerated atorvastatin treatment without any obvious toxicity. Our previous study concerning the role of statins in establishing an innate anti-melanoma immune response used two human melanoma cell lines, LB1319-MEL and BB74-MEL [7]. Here, the WM-266-4 melanoma cell line was chosen to continue this study because when these cells are injected intravenously into nude mice they systematically induce lung metastases that are easy to quantify. We first tested whether the *in vitro* treatment of these cells with a statin could, as previously observed with LB1319-MEL and BB74-MEL cells, induce an overexpression of the NKG2D ligand MICA that leads to an increased sensitivity to NK cell lysis. WM-266-4 cells were treated for 48 h with increasing doses (0,25 to 5  $\mu$ M) of atorvastatin, which induced a weak but significant and reproducible increase in MICA membrane expression (Figures 1A and B). In these cells, lower doses of atorvastatin, such as 0.5 and 1  $\mu$ M, were sufficient to induce a significant increase in MICA expression. These data confirm that statin treatment of human WM-266-4 melanoma cells enhances MICA membrane expression.

### ***Pretreatment of WM-266-4 cells with atorvastatin does not slow down their proliferation in vitro***

We next sought to confirm that atorvastatin is not toxic for WM-266-4 cells. WM-266-4 cells were untreated or pretreated for 48 h with two doses (1 and 5  $\mu$ M) of atorvastatin. Cells were then cultivated *in vitro* and counted every two days. Results show that all cells grew at similar rates, demonstrating that atorvastatin was not toxic (Figure 1C).

### ***Atorvastatin pretreatment reduces local WM-266-4 melanoma growth in vivo***

To investigate the effects of atorvastatin treatment *in vivo*, we performed subcutaneous injection of  $5 \times 10^5$  WM-266-4 cells, either untreated or pretreated for 48 h with 1  $\mu$ M atorvastatin, into the flank of

NMRI nude mice. The resulting tumors showed that WM-266-4 cells pretreated with atorvastatin grew slower than untreated cells (Figure 2). These results are similar to those obtained previously with LB1319-MEL cells [7] and confirm the capacity of the statin to reduce tumor growth at doses that induce MICA overexpression.

#### ***Atorvastatin pretreatment reduces lung metastasis development***

NMRI nu/nu mice have functional NK cells that are able to kill human MICA-positive tumor cells. Therefore, because NK cells play an important role in the control of melanoma metastatic processes [20,21], we tested whether the pretreatment of WM-266-4 cells with atorvastatin could reduce metastasis development. Intravenous injection of melanoma cells followed by lung examination allows a quantitative evaluation of the final steps in metastasis formation. Therefore,  $5 \times 10^5$  WM-266-4 cells either untreated or pretreated for 48 h with 1  $\mu$ M atorvastatin were injected intravenously into the tail vein of nude mice and animals were then sacrificed 20 days later. We observed that mice injected with untreated WM-266-4 cells developed an average of XXX metastases per mouse, while mice injected with WM-266-4 cells pretreated with 1  $\mu$ M atorvastatin developed an average of XXX metastases per mouse (Figure 4A and illustrated by a representative lung photomicrograph with metastatic area lesions in Figure 4B). These results show that atorvastatin pretreatment inhibited melanoma cell colonization of the lungs through metastasis.

#### ***Atorvastatin intraperitoneal injections inhibit subcutaneous melanoma growth***

We next tested whether intraperitoneal injections of atorvastatin could reduce the growth of tumors *in vivo*. One day after subcutaneous implantation of  $5 \times 10^5$  untreated WM-266-4 cells, mice were injected intraperitoneally with 0.1 ml PBS alone or with 30  $\mu$ g atorvastatin daily for 16 consecutive days. This dose of atorvastatin was chosen because it is comparable to that used in humans to treat hypercholesterolemia. We observed that these atorvastatin injections significantly slowed subcutaneous tumor growth (Figure 5).

#### ***Atorvastatin injections increase splenic NK cell concentration and activation***

In an effort to determine the mechanism of action of our observed statin-induced control of melanoma development, we tested the capacity of atorvastatin intraperitoneal injections to increase NK cell activity. Nude mice, which only have innate immune effectors available for immunological rejection of tumor cells, were injected for 6 consecutive days with either 0,1 ml PBS alone or with 30  $\mu$ g atorvastatin. These injections induced a significant increase in splenic NK cell concentration and activation (Figures 5A and B).

Together our data suggest that intraperitoneal atorvastatin injections favored an innate anti-melanoma immune response via two linked mechanisms: an increase in activated NK cells and a tumoral overexpression of the NKG2D ligand MICA, which together facilitated the killing of human

melanoma cells by murine NK cells.

## ***Discussion***

This work follows our first study on the contribution of statins to the innate anti-melanoma immune response [7]. The WM-266-4 melanoma cell line chosen for the present study is useful because it induces easily identifiable and quantifiable lung metastases after intravenous injection. With this tumor cell line we were able to confirm that statin treatment induces the overexpression of membrane-expressed MICA. MICA is expressed on tumors or stressed cells and is a ligand for the activating receptor NKG2D. This receptor, which recognizes both human and murine tumor cells, plays an important role in the immune control of cancers. Using WM-266-4 melanoma cells, we show that the pretreatment of tumor cells with atorvastatin before injection into nude mice induced both a shrinkage of local tumor growth and a reduction in lung metastases. Above all, we demonstrate for the first time that statins, and in particular atorvastatin, may be of interest for the immunotherapy of melanoma. Indeed, the local growth of tumors obtained from the injection of untreated WM-266-4 cells was significantly slower when mice were injected daily with atorvastatin at a dose equivalent to human treatment for cardiovascular problems. Moreover, these injections induced an increase in the presence of activated NK cells in the spleens of injected mice. This is important because since activated NK cells express NKG2D receptors they efficiently kill MICA-positive melanoma cells. Conversely, it has previously been shown in Beige SCID mice, which do not have functional NK cells, that oral treatment with atorvastatin does not significantly reduce subcutaneous melanoma development [17]. These data strongly suggest that in our experimental nude mouse model, the atorvastatin-induced control of subcutaneous melanoma growth is dependent on NK cell activity. Moreover, previous studies of the anti-inflammatory effects of atorvastatin [22,23] suggest that in our experiments the atorvastatin-induced increase in activated (CD69+) NK cells is not linked to a direct effect of atorvastatin on NK cells but is more likely due to atorvastatin-induced MICA overexpression in melanoma cells. However, intraperitoneal statin injections induce systemic disruptions, which could also interfere with the innate anti-melanoma immune response by acting on  $T\gamma\delta$  cells. Moreover, several cellular functions involving GTPases of the Ras family are likely to be disrupted by these statin injections. Interestingly Collisson *et al.* showed that, independently of the immune response, and at plasma concentrations similar to those used to treat hypercholesterolemia, atorvastatin inhibited the *in vivo* metastasis of melanoma cells overexpressing RhoC [17]. In our previous work we have shown that inhibitors of the RhoA GTPase favor an adaptive anti-melanoma immune response [3,4,5], and more recently we have described a beneficial role of statins in favoring the innate component of this immune response [7]. The present paper reinforces the idea that statins, and in particular atorvastatin, could be promising drugs for melanoma therapy.

## Acknowledgements

This work was supported by INSERM and by grants from Ligue Contre le Cancer, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and Institut Claudius Regaud.

## References

1. Chen ST, Geller AC, Tsao H (2013) Update on the Epidemiology of Melanoma. *Curr Dermatol Rep* 2: 24-34.
2. Zwald FO, Christenson LJ, Billingsley EM, Zeitouni NC, Ratner D, et al. (2010) Melanoma in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 10: 1297-1304.
3. Sarrabayrouse G, Pich C, Moriez R, Armand-Labit V, Rochaix P, et al. (2010) Melanoma cells treated with GGTI and IFN-gamma allow murine vaccination and enhance cytotoxic response against human melanoma cells. *PLoS One* 5: e9043.
4. Sarrabayrouse G, Synaeve C, Leveque K, Favre G, Tilkin-Mariame AF (2007) Statins stimulate in vitro membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells. *Neoplasia* 9: 1078-1090.
5. Tilkin-Mariame AF, Cormary C, Ferro N, Sarrabayrouse G, Lajoie-Mazenc I, et al. (2005) Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. *FASEB J* 19: 1513-1515.
6. Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9: 495-502.
7. Pich C, Teiti I, Rochaix P, Mariame B, Couderc B, et al. (2013) Statins Reduce Melanoma Development and Metastasis through MICA Overexpression. *Front Immunol* 4: 62.
8. Zhang C, Wang Y, Zhou Z, Zhang J, Tian Z (2009) Sodium butyrate upregulates expression of NKG2D ligand MICA/B in HeLa and HepG2 cell lines and increases their susceptibility to NK lysis. *Cancer Immunol Immunother* 58: 1275-1285.
9. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, et al. (2008) NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28: 571-580.
10. Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, Domaica CI, Rossi LE, et al. (2008) Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 180: 4606-4614.
11. Heasman SJ, Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 690-701.
12. Balakumar P, Mahadevan N (2012) Interplay between statins and PPARs in improving cardiovascular outcomes: a double-edged sword? *Br J Pharmacol* 165: 373-379.
13. Boudreau DM, Yu O, Johnson J (2010) Statin use and cancer risk: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Saf* 9: 603-621.
14. Demierre MF (2005) Consideration of statins for chemoprevention of cutaneous melanoma. *J Drugs Dermatol* 4: 125-128.
15. Jacobs EJ, Newton CC, Thun MJ, Gapstur SM (2011) Long-term use of cholesterol-lowering drugs and cancer incidence in a large United States cohort. *Cancer Res* 71: 1763-1771.
16. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO (2000) Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406: 532-535.
17. Collisson EA, Kleer C, Wu M, De A, Gambhir SS, et al. (2003) Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2: 941-948.
18. Pages C, Rochaix P, al Saati T, Valmary-Degano S, Boulinguez S, et al. (2008) KBA.62: a useful marker for primary and metastatic melanomas. *Hum Pathol* 39: 1136-1142.
19. Bernini F, Poli A, Paoletti R (2001) Safety of HMG-CoA reductase inhibitors: focus on atorvastatin. *Cardiovasc Drugs Ther* 15: 211-218.



20. Merzoug LB, Marie S, Satoh-Takayama N, Lesjean S, Albanesi M, et al. (2014) Conditional ablation of NKp46+ cells using a novel Ncr1(greenCre) mouse strain: NK cells are essential for protection against pulmonary B16 metastases. *Eur J Immunol* 44: 3380-3391.
21. Mirjadic Martinovic KM, Babovic N, Dzodic RR, Jurisic VB, Tanic NT, et al. (2014) Decreased expression of NKG2D, NKp46, DNAM-1 receptors, and intracellular perforin and STAT-1 effector molecules in NK cells and their dim and bright subsets in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res* 24: 295-304.
22. Blaschke S, Viereck V, Schwarz G, Klinger HM, Guerluek S, et al. (2009) Anti-inflammatory effects of atorvastatin on peripheral blood mononuclear cells and synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 38: 235-239.
23. Crosbie J, Magnussen M, Dornbier R, Iannone A, Steele TA (2013) Statins inhibit proliferation and cytotoxicity of a human leukemic natural killer cell line. *Biomark Res* 1: 33.

## ***Figures: Titles and legends***

### **FIGURE 1. Atorvastatin treatment induces MICA overexpression on WM-266-4 cells.**

WM-266-4 cells were treated with Atorvastatin (Ator) for 48 h at indicated concentrations or not. MICA membrane expression was analyzed by flow cytometry. A representative experiment is illustrated in (A). To pool three independent experiments, the index of specific fluorescence (ISF) was calculated as indicated in the Section “Materials and Methods” (B). Results are expressed as mean  $\pm$  SD [error bars, n = 3 experiments (B)]. \*P < 0.05; \*\*P < 0.005 versus control condition using the ANOVA Tukey test.

### **FIGURE 2. Atorvastatin treatment does not affect WM-266-4 cells proliferation *in vitro*.**

WM-266-4 cells were treated with 1 $\mu$ M or 5 $\mu$ M of Atorvastatin (Ator) for 48 h or untreated. The cells were then cultivated and every 2–3 days pretreated (Ator) and untreated WM-266-4 cells were counted to evaluate the *in vitro* proliferation. Results are illustrated as mean  $\pm$  SEM (error bars, n = 3 experiments). ns versus control condition using the two-way ANOVA test.

### **FIGURE 3. Atorvastatin pretreatment reduces local *in vivo* WM-266-4 melanoma growth.**

5x10<sup>5</sup> WM-266-4 cells untreated or pretreated with Atorvastatin at 1  $\mu$ M for 48 h (Ator) were injected subcutaneously into the flank of four NMRI nu/nu mice. Tumor growth was measured every 2–3 days. Results are illustrated as mean  $\pm$  SEM (error bars, n = 1 experiment). \*P < 0.05; \*\*P < 0.005 versus control condition using the two-way ANOVA test.

### **FIGURE 4. Atorvastatin pretreatment reduces lung metastases development.**

5x10<sup>5</sup> WM-266-4 cells untreated or pretreated with Atorvastatin at 1  $\mu$ M for 48 h (Ator) were injected intravenously into the tail vein of 8 NMRI nu/nu mice. Lung metastases were microscopically quantified and measured after IHC staining (A). Results are illustrated as ratio of metastatic area in lungs. A representative lung photomicrograph with metastatic areas lesions is shown (B).

**FIGURE 5. Daily intra-peritoneal injections of Atorvastatin reduce *in vivo* local untreated melanoma growth.**

$5 \times 10^5$  untreated WM-266-4 cells were injected subcutaneously into the flank of eleven NMRI nu/nu mice. Mice were then treated by daily IP injections with either PBS alone or with 30  $\mu$ g (1mg/kg) Atorvastatin. Local tumor sizes were measured serially. The results are expressed as mean size ( $\text{mm}^2$ ) of tumors from group of nine mice each. Results are illustrated as mean  $\pm$  SEM (error bars, n = 2 experiments). \*\*P < 0.005; \*\*\*P < 0.001 versus control condition using the two-way ANOVA test.

**FIGURE 6. Daily intra-peritoneal injections of Atorvastatin increases splenic NK cells concentration and activation.**

Two groups of four nude mice were injected IP with 0,1 ml PBS alone or with 30  $\mu$ g Atorvastatin for 6 consecutive days. Mice were sacrificed the following day. Splenic NK cells concentration was detected by flow cytometry with anti-NK1.1-APC mAb (A) and activated NK cells with anti-CD69-PE and anti-NK1.1-APC mAb (B). Results are expressed as % of splenic cells (error bars, n=2 experiments). \*P<0,05 and \*\*P<0,005 versus control condition (PBS) using *t-test*.

Figure 1

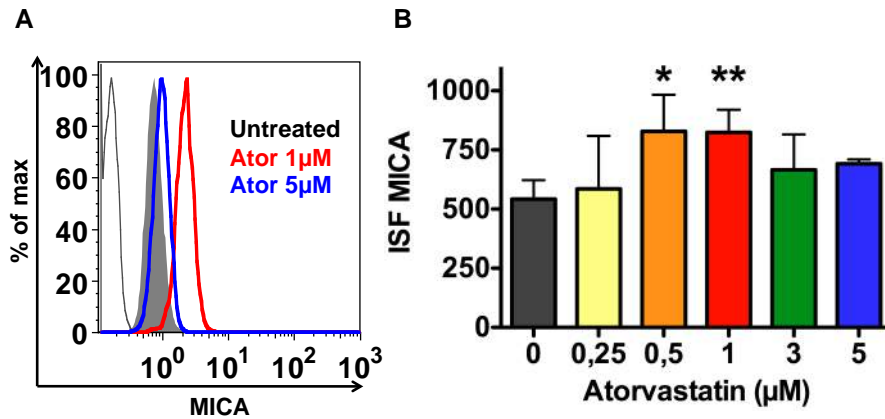


Figure 2

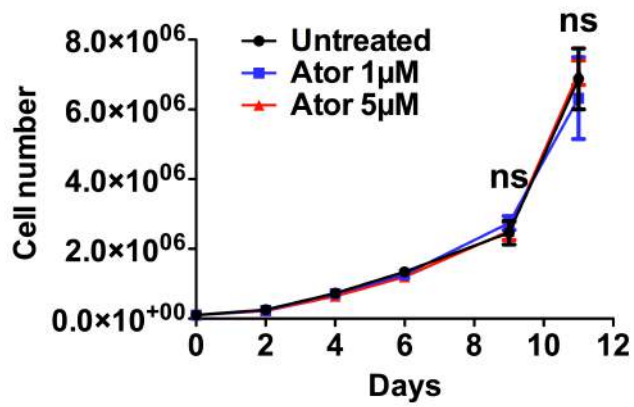


Figure 3

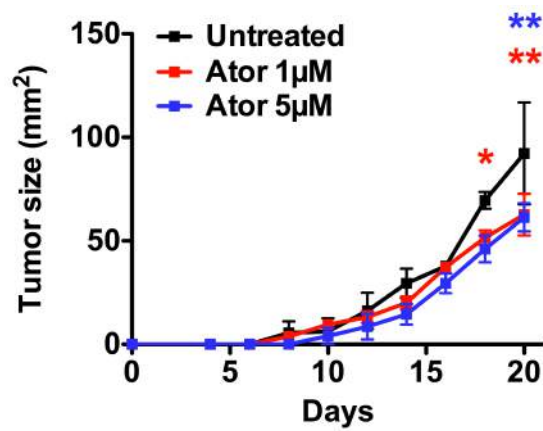


Figure 4

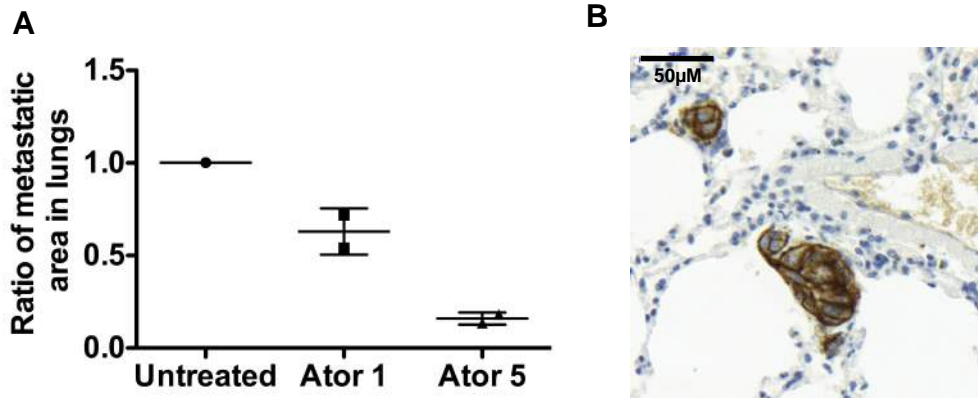


Figure 5

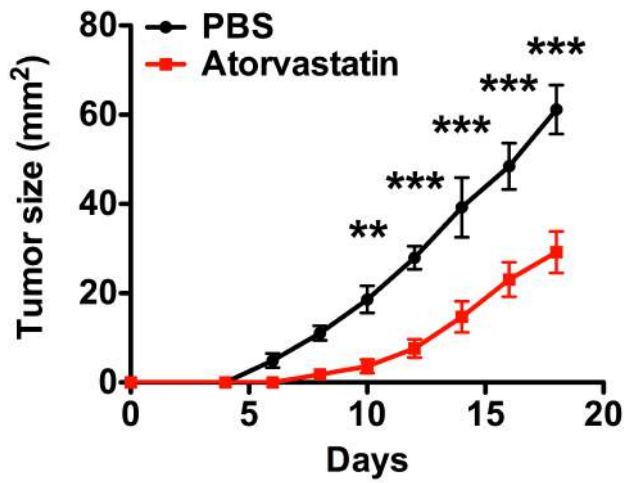
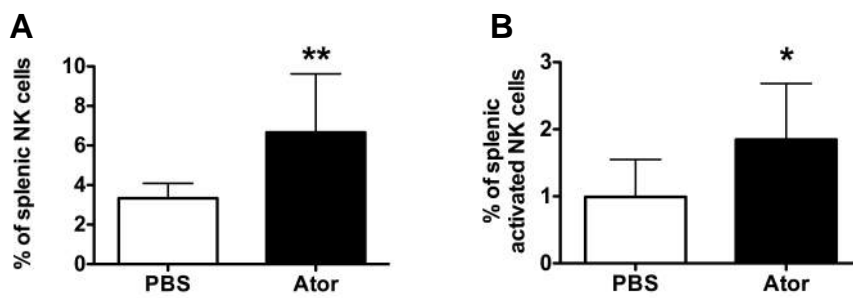


Figure 6



## Résultats III

### Melanoma expressed CD70 involvement in invasion and metastasis

Christine Pich\*, Guillaume Sarrabayrouse\*, **Iotefa Teiti**, Bernard Mariamé, Philippe Rochaix, Laurence Lamant, Audrey Delmas, Gilles Favre, Véronique Maisongrosse, and Anne-Françoise Tilkin-Mariamé

*\* Les co-premiers auteurs ont contribué de façon égale à ce travail*

#### Article soumis à British Journal of Cancer

Dans plus de 80% des cas, l'exérèse chirurgicale d'un mélanome primaire suffit et il n'y a pas apparition de métastases (Belot et al, 2008). Dans les 20% restants, les mélanomes sont métastatiques et les traitements actuels ont une efficacité modérée. La recherche de marqueurs pronostiques pour l'agressivité du mélanome est donc absolument nécessaire.

CD70 (CD27L) est une molécule de costimulation de la famille du TNF. Elle est exprimée sous forme homotrimérique sur les LT, LB, et CD activés (Denoeud & Moser, 2011; Nolte et al, 2009) mais aussi sur certaines tumeurs solides comme les glioblastomes, les cancers du sein et les carcinomes rénaux (Diegmann et al, 2006; Petrau et al, 2014; Wischhusen et al, 2002). Dans les lymphocytes, la fixation de CD70 sur CD27 initie une signalisation intracellulaire nécessaire à la cytotoxicité et la mémoire immune. De plus, la trimérisation de CD70 par un anticorps monoclonal QA32 déclenche la signalisation de la voie des MAPK et une activation des LT (Garcia et al, 2004).

Comme notre équipe avait précédemment montré que CD70, exprimé sur des cellules de carcinome mammaire murin, favorise la mise en place d'une réponse immune anti tumorale protectrice (Cormary et al, 2004; Cormary et al, 2005), nous avons voulu déterminer si les mélanomes humains exprimaient spontanément la molécule CD70 et quel était son rôle dans ces tumeurs.

Grâce à des analyses en immunohistochimie, nous avons mis en évidence pour la 1ère fois l'expression membranaire de CD70 sur des biopsies de patients atteints de mélanome de différents stades. En comparaison avec les métastases (cutanées ou ganglionnaires), le pourcentage de cellules tumorales CD70+ est significativement plus important dans les mélanomes primitifs (37% versus 95% respectivement). Le niveau d'expression de CD70 est également plus important dans les mélanomes primitifs. L'expression de CD70 a aussi été étudiée dans neuf lignées de mélanomes. Six lignées sont négatives mais trois lignées expriment à des degrés divers la molécule CD70. Ainsi, toutes les cellules de la lignée LB1319-MEL expriment CD70, alors que 20% des cellules de la lignée LB39-MEL expriment CD70. Pour réaliser l'étude de la fonction de CD70, nous avons cloné cellulièrement la lignée LB39- MEL pour obtenir des clones CD70+ et CD70-. Les analyses protéiques montrent que ce

sont les formes monomériques et trimériques de CD70 qui sont détectées en membrane, alors que CD70 est surtout présente sous forme monomérique dans le cytoplasme.

Au niveau fonctionnel, nous avons prouvé que l'expression de CD70 est corrélée avec une diminution des capacités d'implantation métastatique pulmonaire (testées *in vivo*) via une diminution des capacités invasives (testées *in vitro*). Pour les tests *in vivo*, nous avons transfecté le mélanome murin B16F10 soit avec un plasmide codant pour la protéine CD70 soit avec son contrôle. Nous avons injecté ces cellules par voie intraveineuse dans des souris immunocompétentes C57BL/6 wt, ou immunodéprimées C57BL/6 IFN $\gamma$ -KO et NMRI nu/nu. Les énumérations macro- et microscopiques des métastases pulmonaires présentes chez ces souris ont mis en évidence que l'expression de CD70 limite l'implantation pulmonaire des cellules de mélanome. De façon intéressante, cette propriété de CD70 ne dépend pas de sa fonction immunologique puisqu'elle est retrouvée aussi bien chez les souris immunocompétentes que chez les souris immunodéprimées. Ensuite, des analyses *in vitro* par des tests de migration et d'invasion en chambres de Boyden et en sphéroïdes 3D, nous ont permis de montrer que l'expression de CD70 diminue les capacités de migration et d'invasion des cellules de mélanomes. Cependant, lorsque les cellules de mélanome CD70+ sont traitées avec l'anticorps anti-CD70 QA32 fonctionnel, la migration et l'invasion des mélanomes CD70+ sont significativement augmentées et se rapprochent de celles des mélanomes CD70-. Ces résultats suggèrent que l'expression basale de CD70 est associée à une inhibition de voies intracellulaires favorisant les capacités invasives des cellules de mélanome et que la fixation de l'anticorps anti-CD70 promeut ces voies. Nous avons déterminé que la fixation de cet anticorps anti-CD70 induit la surexpression de CD70 sous sa forme homotrimérique fonctionnelle. En parallèle, cette fixation induit l'activation de la voie BRAF/MEK/ERK, la surexpression de la GTPase RhoE et l'inhibition des fibres de stress d'actine et des points focaux d'adhésion. Il s'avère que les voies des MAPK, de RhoE et des fibres de stress régulent la mobilité cellulaire et la génération de métastases des mélanomes. Ainsi, nos résultats suggèrent que la forme homotrimérique de CD70 induit une signalisation qui favorise l'activation de la voie pro-métastatique BRAF/MEK/ERK, la surexpression de RhoE et l'inhibition des fibres de stress d'actine et des points focaux d'adhésion.

Nos travaux révèlent une nouvelle fonction non-immunologique de CD70 qui agit sur l'invasion du mélanome en régulant les voies des MAPK, RhoE et le cytosquelette. Cette étude suggère que CD70 serait un marqueur de sous-populations de mélanome présentant un pouvoir métastatique diminué.

## Melanoma-expressed CD70 is involved in invasion and metastasis

Christine Pich<sup>1,2,a</sup>, Guillaume Sarrabayrouse<sup>1,2,a</sup>, Iotefa Teiti<sup>1,2</sup>, Bernard Mariamé<sup>2,4</sup>, Philippe Rochaix<sup>3</sup>, Laurence Lamant<sup>1,3</sup>, Gilles Favre<sup>1,2,3</sup>, Véronique Maisongrosse<sup>3</sup>, and Anne-Françoise Tilkin-Mariamé<sup>1,2</sup>

<sup>a</sup> Co-first authors

<sup>1</sup> Unité INSERM UMR 1037, CRCT, Toulouse F-31037, France

<sup>2</sup> Université Paul Sabatier, Toulouse F-31062, France

<sup>3</sup> Institut Universitaire du Cancer - IUCT, Toulouse F-31059, France

<sup>4</sup> ITAV, USR 3505, 1 Place Potier, Toulouse F-31106, France

**Running title:** CD70 regulates melanoma invasion

**Keywords:** melanoma, CD70, metastasis, invasion, MAPK pathway

**Corresponding Author:**

Anne-Françoise Tilkin-Mariamé, PhD

INSERM U1037 - Université Toulouse 3 - ERL5294 CNRS

2 avenue Hubert Curien

31037 TOULOUSE - FRANCE

Tel: 05.82.74.16.13

E-mail: anne-francoise.tilkin@inserm.fr

## Abstract

**Background:** CD70 is a costimulatory molecule of the Tumour Necrosis Factor family expressed in activated immune cells and some solid tumours including renal cell carcinomas and glioblastomas. In lymphocytes CD70 binding induces CD27 receptor trimerisation, initiating intracellular signalling involved in immune cytotoxicity and memory. CD70 cross-linking using a monoclonal antibody (QA32) triggers T-cell-mediated cytotoxicity and Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) phosphorylation.

**Results:** We report that CD70 is expressed in human melanoma cell lines and tumour cells from melanoma biopsies. This expression was observed in 95% of primary melanomas but only 37% of metastases. Both the monomeric and trimeric forms of CD70 were detected in tumor cell membrane fractions, whereas cytoplasmic fractions contained almost exclusively monomeric CD70. *In vitro* and *in vivo* experiments demonstrated that CD70 expression inhibited melanoma cell migration, invasion and pulmonary metastasis implantation independently of the tumour immune microenvironment. Increasing the levels of the trimeric form of CD70 through QA32 binding led to an increase in CD70+ melanoma cell invasiveness through MAPK pathway activation, RhoE overexpression and the disappearance of stress fibres and focal adhesions.

**Conclusion:** Our results describe a new non-immunological function of melanoma-expressed CD70, which involves melanoma invasiveness through the MAPK pathway, RhoE and cytoskeletal modulation.

## Introduction

Melanomas arise from melanocytes and are the most aggressive and metastatic form of skin cancer. Melanoma progression results from the acquisition of molecular alterations that generate increasingly malignant phenotypes. Around 50% of melanomas contain mutations in the serine/threonine kinase BRAF, with the BRAFV600E mutation being particularly common. Mutated BRAF induces the constitutive activation of the MAPK pathway which is involved in crucial cellular processes such as proliferation and differentiation, and which favours tumour invasiveness (Ades and Metzger-Filho, 2012, Liang et al., 2007). Mutant BRAF also regulates RhoE (Rnd3) expression, which promotes cancer invasion through its actions on the actin cytoskeleton and the focal adhesions (Klein and Aplin, 2009)(Riou et al., 2010). The use of pharmacological inhibitors of the MAPK pathway has shown promise for melanoma patients with mutated BRAF, however once metastasis occurs treatment options remain very limited (Ades and Metzger-Filho, 2012).

CD70 is a type II transmembrane costimulatory molecule. It is a member of the TNF superfamily and is expressed in activated NK cells and T- and B-lymphocytes in which it plays important immunological roles through binding to its receptor, CD27 (Denoeud and Moser, 2011). CD70 is functional in its membranous homotrimeric form that, upon engagement, induces the trimerisation of



the CD27 receptor and the initiation of intracellular signalling. By itself CD70 also plays an active role in T-lymphocyte since CD70 cross-linking induced by the binding of CD70-specific mAb QA32 has been shown to trigger T-cell-mediated cytotoxicity and MAPK phosphorylation (Garcia et al., 2004). Some tumour cells have been shown to express CD70, including lymphomas (Grewal, 2008), renal cell carcinomas and glioblastomas (Wischhusen et al., 2002).

In the present study, we reveal that CD70 is ectopically expressed in most primary human melanomas and that its expression then decreases and is often lost in the subsequent metastases. Interestingly, we found that CD70 expression dramatically reduced pulmonary metastatic implantation, which was linked to the decreased migration and invasive capacities of CD70-positive melanoma cells and was independent of the tumour immune microenvironment. A CD70-specific mAb (QA32) was able to bind to CD70-positive melanoma cells, inducing an enhancement of the trimeric CD70 form and restoring tumour mobility. This was mediated through over-activation of the MAPK pathway and over-expression of RhoE, leading to the disappearance of stress fibres and focal adhesions.

## Materials and Methods

### *Tumour cell lines and mice*

Human melanoma cell lines: LB1319-MEL (wild type NRAS and BRAF), LB39-MEL (wild type NRAS and mutated BRAFV600E), and three melanoma cell lines derived from the same patient LB33-MEL (all wild type NRAS and BRAF): LB33-MEL A (cutaneous metastasis developed in 1988); LB33-MEL.B (lymph node metastasis developed in 1993) and LB33-MEL.D (intestinal metastasis developed in 1999) were provided by Pr. T. Boon (LICR, Brussels). B16F10 murine melanoma cells were purchased from the ATCC. B16F10-CD70 and its control cell line B16F10-wt were produced in our laboratory by genetic modification of B16F10 (Cormary et al., 2005). All tumour cells were maintained in RPMI 1640/10% FCS.

Six- to eight-wk-old female C57BL/6 and NMRI nu/nu mice (Elevages Janvier) and C57BL/6 IFN- $\gamma$  KO mice produced in our animal facility (agreement n°B.31.555.26) were used for *in vivo* experiments. All experiments involving mice were done using appropriate conditions, supervised by Regional ethic Committee of Midi-Pyrénées (agreement ICR-2009-0011 and ICR-2009-0020).

### *CD70 immunohistochemical (IHC) detection in melanoma tumour specimens*

Two CD70 specific mAbs and two methods were used to detect CD70 in melanoma tumour samples: - IHC was performed on 4- $\mu$ m-thick routinely processed formalin fixed paraffin embedded sections of tumour specimens with neighbouring normal tissue. Before incubation with the Abs a heat-induced epitope retrieval technique in a citrate buffer (pH6) was performed. The CD70 specific mAb (QA32 hybridoma supernatant) was incubated 30 min and revealed using EnVision™ G|2 System/AP (Dako,

Glostrup, Denmark) enzyme-conjugated polymer backbone according to manufacturer protocol and visualized by Permanent Red Chromogen (Fas Red) included in the kit. The IHC was processed using an Autostainer plus (Dako, Glostrup, Denmark) slide processor.

- Stainings were also performed on cryostat sections, which were fixed and dried before incubation with anti-CD70 mAb (clone Ki-24 from BD Biosciences) diluted 1:50 in TBS plus 5% BSA overnight at 4°C and then with secondary biotinylated goat anti-mouse Ab (KIT Dako) at 1:200 dilution for 30 min. Bound Ab was detected with streptavidin-alkaline phosphatase-kit (VECTOR) at room temperature in humidified chamber. Photos were taken with a DM 3000 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and a CMS GmbH DFC 295 camera (Leica Microsystems). The slides were subsequently counterstained with hemalun.

In melanoma specimens, 2% of CD70+ tumour cells was used as threshold value, because detection of rare and isolated CD70+ tumour cells was often observed in less than 2% of melanoma cells and we considered that these observations were not significant. For each tumour specimen a slide was totally analysed by a pathologist and a biologist. These analyses were done independently and blind. Locoregional differences between epidermal and dermal CD70 expression were observed in most specimens and were considered.

The expressions of two tumour associated antigens: MelanA and KBA.62 were detected with specific mAbs ready to use from DAKO revealed by FLEX/HRP (20 min incubation) then by FLEX DAB+ Sub-Chromo (10 min incubation) and FLEX Hematoxylin (5 min incubation).

Local ethic committee approved analysis of human melanomas (agreement ICRCRB DC-2011-1364).

### ***Flow cytometric analyses***

Membrane CD70 expression was detected with PE-conjugated anti-CD70 mAb and control isotype (BD Bioscience) and analysed on a BD FACS Calibur. To compare several analyses, index of specific fluorescence (ISF) was calculated using the following formula: (median fluorescence intensity (MFI) with the specific antibody - MFI with the isotype control) / MFI with the isotype control x 100.

### ***Selection of LB39-MEL CD70 positive and CD70 negative clones***

LB39-MEL cells were stained with PE-conjugated anti-CD70 mAb (BD Biosciences). CD70+ and CD70- subpopulations were first sorted with Becton Dickinson FACS AriaII. Then a cellular cloning allowed the isolation of LB39-MEL CD70+ and CD70- clones.

### ***Western blot analyses***

Cells were lysed and protein extracts were prepared by the standard procedure (10) and then separated on sodium SDS-PAGE gel electrophoresis. Proteins were blotted onto PVDF membranes. The filters were incubated at 4°C overnight with primary Abs against CD70, MEK, P-MEK, ERK, P-ERK, RhoE, ROCK1 and ROCK2 (Tebu-Bio, Santa Cruz Biotechnology and Ozyme, Cell Signaling). Actin

was used as a loading control (Chemicon). The Hybond-p membranes (GE Healthcare) were then incubated with HRP-labelled secondary Ab (R&D System) for 1 h at room temperature and then detected with a chemiluminescence detection ECL kit (Thermo Scientific Pierce). Band intensities were quantified using ImageJ software.

To analyse CD70 expression, in melanoma cells cytosolic and membrane fractions, the plasma membrane protein extraction kit of Biovision Incorporated (CA95035 USA) was used according to the manufacturer protocol before western blot analysis.

### ***Pulmonary metastases implantation***

C57BL/6 mice (-wt or -IFN- $\gamma$  KO) and NMRI nu/nu mice were injected i.v. with B16F10-wt or B16F10-CD70 cells ( $1 \times 10^5$ ). Mice were sacrificed 10 days later. Macroscopic metastases were detected visually and quantified. NMRI nu/nu mice were injected i.v. with LB1319-MEL cells transfected with siCtrl or siCD70 ( $1 \times 10^6$ ). Mice were sacrificed 30 days later. The lungs were fixed in formalin and paraffin embedded to visualize microscopic metastases.

Photos were taken with a DMR microscope (Leica Microsystems) and a DS-Fi1 camera (Nikon Instruments). The experiments included 3 to 5 mice/group and were repeated twice.

### ***Transfection of siRNAs***

LB1319-MEL melanoma cells were transiently transfected with siRNAs, as previously described (Tilkin-Mariame et al., 2005). Briefly,  $5 \times 10^5$  cells were transfected with 2,5 nM siRNA using JetPrime (Polyplus Transfection). The following siRNA duplexes, purchased from Thermo Fisher, were used: siCD70 pool (CACCAAGGUUGUACCAUUG, GCAUCUACAUGGUACACAU, GCAGCUGAAUCACACAGGA, UGACCACUGCUGCUGAUUA) and a non-targeting siNegative pool (siNeg) (UGGUUUACAUGUCGACUAA, UGGUUUACAUGUUGUGUGA, UGGUUUACAUGUUUCUGA, UGGUUUACAUGUUUCCUA).

### ***Cell migration and invasion in vitro assays***

Migration and invasion assays were performed in presence or not of Ctrl Ig (Y3 hybridoma supernatant diluted to half) or anti-CD70 mAb (QA32 hybridoma supernatant diluted to half). Migration and invasion studies were performed using triplicate or quadruplicate wells. Migration assays were performed with 8- $\mu$ m pore size transwell system (BD Biosciences).  $2.5 \times 10^4$ /well melanoma cells were added in RPMI1640/2% FCS and with Ctrl Ig or anti-CD70 mAb (QA32) in the upper compartment of the filter. The bottom chamber was filled with RPMI1640/10% FCS. After 24 h, cells on the bottom surface of the filter were stained and counted. Migration was also tested by Wound-healing assays.  $2.5 \times 10^4$  melanoma cells were plated on collagen type I (5mg/cm<sup>2</sup>, BD Biosciences) and treated with Ctrl Ig or anti-CD70 mAb. Two days later, a section of a confluent cell monolayer was produced, by scratching. The ability of cells to migrate into the cleared section was

monitored. Photos were taken with an Eclipse Ti microscope (Nikon Instruments) and a CoolSNAP HQ2 camera (Photometrics) in three randomized fields.

The protocol is similar for invasion assays, but invasion chambers (BD Biosciences) were used and melanoma cells that have passed through the matrigel were counted 48 h later.

### ***Three-Dimensional spheroid invasion***

Formation of 3D spheroids occurred after 72 h at 37°C using  $1 \times 10^3$  LB1319-MEL cells/well on 96-well plate coated with 1% agarose (Interchim). Spheroids were then embedded into a bovine collagen I gel containing EMEM, L-glutamine and 2% FBS with or without QA32 mAb (hybridoma supernatant diluted to half) for 24 h. Then MEK inhibitor U0126 (Calbiochem) was added or not at 5  $\mu$ M. Spheroids sizes were measured and photos were taken after 72 h, using an Eclipse Ti microscope (Nikon Instruments) and a CoolSNAP HQ2 camera (Photometrics).

### ***Immunofluorescence staining of stress fibers and focal adhesions***

Melanoma cells ( $2,5 \times 10^4$ ) were plated on poly-lysine (0,001%, Sigma) coated coverslips in 6-well plates and treated with Ctrl Ig (Y3 hybridoma supernatant diluted to half) or anti-CD70 Ab (QA32 hybridoma supernatant diluted to half). After 24 or 48 hours, cells were fixed with cold Cristal, labelled with anti-vinculin (Sigma) and detected by anti-GAM-AlexaFluor488 Ab and phalloidin-AlexaFluor594 (Sigma). Coverslips were mounted on slides using ProLong/DAPI (Invitrogen). After an overnight incubation at 4°C, photos were taken using an Eclipse Ti microscope and a CoolSNAP HQ2 camera in three randomized fields.

### ***Statistical analysis***

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Significance of analyses was assessed by t-test, Mann-Whitney test or Tukey one-way ANOVA test. All statistic tests were two-sides. The values are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) in the figures. P-values under .05 were considered statistically significant.

## **Results**

### ***CD70 ectopic expression in melanomas***

To assess CD70 expression in human melanoma cells, immunohistochemistry (IHC) was used to screen 19 primary and 24 metastatic melanoma specimens. CD70 expression was detected with two CD70-specific mAbs: QA32 hybridoma (Figure 1A) and Ki-24 from BD Biosciences (Figure 1B) (Garcia et al., 2004), both revealed using Fast Red. The melanoma biopsies were simultaneously stained with two mAbs specific for the melanoma-associated antigens MelanA and KBA-62 (Pages et

al., 2008), and were revealed using HRP/DAB (Figure 1C). Specimens of healthy skin were also stained as negative controls (Supplemental Figure 1). CD70 was mainly detected in the cytosol of the tumour cells. Further analysis of CD70 expression showed that 95% (18/19) of primary tumours versus 37% (9/24) of the skin and lymph node metastases contained a significant (greater than 2%) fraction of CD70+ tumour cells. Primary melanomas also showed a significantly higher percentage of CD70+ tumour cells (Figure 1D) and a significant increase in the expression levels of CD70, although CD70 expression was variable among the different specimens (Figure 1E).

This CD70 ectopic expression was also observed in four human melanoma cell lines, using flow cytometry. Of these, the LB1319-MEL line was strongly and homogeneously CD70+, whilst the other three cell lines, LB39-MEL, LB33-MEL.A, and LB33-MEL.B, had a subpopulation of 5 to 50% of cells expressing CD70 (Figures 2A and B). CD70+ and CD70- clones were isolated from the LB39-MEL cell line (Figure 2A) and their CD70 expression remained stable for more than 10 passages.

To monitor CD70 expression over the course of disease progression, flow cytometry was used to analyse three melanoma cell lines that had been derived at different times and from different metastatic localizations of the same patient, LB33-MEL: a cutaneous metastasis, a lymph node metastasis which appeared 5 years later, and an intestinal metastasis which appeared a further 6 years later (Chiari et al., 2000). These samples showed that CD70 expression decreased and even disappeared over time as the disease progressed (Figure 2B), a result which was also observed using IHC analysis of two other patients (Figure 2C and data not shown).

The sub-cellular localisation of CD70 in melanoma cells was analysed by western blotting of the subcellular fractions of LB1319-MEL cells. Both the monomeric and trimeric forms of CD70 were detected in the global fraction, indicating that these CD70 molecules were functional. Both forms were also detected in the membranous fraction, whereas the cytosolic fraction contained almost exclusively the monomeric form (Figure 2D). As a positive control, we used a murine melanoma cell line developed by Cormary et al (Cormary et al., 2005) that stably expresses CD70 (B16F10-CD70). Both the monomeric and trimeric forms were expressed in these cells (Figure 2D).

Altogether these data showed that most human primary melanomas express CD70 and that its levels tend to decrease in metastasis.

### ***CD70 expression reduces the metastatic capacity of melanoma cells***

The genetically modified murine melanoma cell lines B16F10-wt and B16F10-CD70 (Cormary et al., 2005) were first used to investigate the *in vivo* function of CD70 in melanoma cells. Cells from these lines were subcutaneously injected into three murine models: C57BL/6 immunocompetent mice, C57BL/6-IFN- $\gamma$ KO and NMRI nu/nu immunocompromised mice. In all three models, CD70+ and CD70- tumours grew locally at similar rates (Supplemental Figure 2). On the contrary, when these cells were intravenously injected, all three models showed significantly less metastases in the lungs of

mice injected with CD70+ melanoma cells (Figure 3A and B), showing that CD70 expression decreased the metastatic implantation capacity of the melanoma cells.

This decrease in the metastatic implantation potential of CD70-expressing melanoma cells was confirmed using human CD70+ melanoma cells. No lung metastases appeared after intravenous injection of CD70+ LB1319-MEL cells (wt and siCtrl) into NMRI nu/nu mice (Figure 3D), whereas siRNA-mediated silencing of CD70 (siCD70) (Figure 3C) in these melanoma cells before intravenous injection induced lung metastasis development as shown in Figure 3D and illustrated in Figure 3E.

If we compare the number of metastases induced by the B16F10-wt versus the B16F10-CD70 cells in the three murine models (Figure 3A), it is obvious that the immunocompromised mice developed more metastases than the immunocompetent mice, suggesting that immune effector cells of the tumour microenvironment, such as T-lymphocytes and IFN- $\gamma$ -secreting cells, partially controlled metastatic lung colonization. However, the 7-fold decrease in the number of lung metastases in mice intravenously-injected with CD70+ cells compared to CD70- cells was similar for all three mouse models, confirming that CD70 reduces metastatic implantation efficacy by a mechanism that is independent of the tumour immune microenvironment. Therefore, we hypothesised that this decrease in metastatic potential was due to an intrinsic property of CD70 within melanoma cells.

#### ***CD70 reduces melanoma cell migration and invasion capacities in vitro***

To elucidate the mechanism involved in the CD70-mediated metastatic reduction, CD70+ and CD70- murine (B16F10-CD70 versus B16F10-wt) and human (LB39-MEL-CD70+ versus LB39-MEL-CD70- and LB1319-MEL) melanoma cells were used to study *in vitro* migration and invasion, both of which are essential for metastasis. Wound-healing, transwell and Boyden chamber assays showed that CD70 expression inhibited B16F10 melanoma migration (Figures 4A and C) and invasion (Figure 4B). Similar experiments with human melanoma cells also confirmed that CD70 expression significantly inhibited migration (Figure 4D) and invasion (Figure 4E). Interestingly, addition of the CD70-specific mAb QA32 to the culture medium reversed the inhibition of migration and invasion (Figures 4A, B, D and E). This QA32 mAb is known to cross-link CD70 molecules and activates a signalling pathway in T-lymphocytes (Garcia et al., 2004).

As these experiments were done *in vitro* with melanoma cells alone, they show that the role of CD70 in migration and invasion is intrinsic, and can be modulated by inducing CD70 signalling via the anti-CD70 mAb QA32.

#### ***Anti-CD70 mAb binding favours the trimeric CD70 form and induces melanoma cell invasion through MAPK pathway activation, RhoE overexpression and cytoskeleton modifications in vitro***

Since CD70 expression correlated with poor migration and invasive capacities which were restored with anti-CD70 (QA32) binding, we hypothesised that QA32 binding was able to modify the melanoma-expressed CD70 to induce a signalling pathway involved in melanoma invasion and

metastasis. Western blot analyses showed that the addition of QA32 to the culture medium significantly increased the ratio between the trimeric and monomeric forms of CD70 (Figures 5A and B). Therefore, we hypothesised that the trimeric form of CD70 positively regulated a signalling pathway involved in melanoma migration and invasion. Previous publications have suggested that this signalling pathway could include the MAPK pathway since anti-CD70 mAb binding was shown to induce the activation of the MAPK pathway in EBV-transformed B-cells and in CD70+ T-lymphocytes (Garcia et al., 2004, Park et al., 2010). In addition, the MAPK pathway is known to regulate migration, invasion, and metastasis in several tumour models, including melanomas (Liang et al., 2007, Dua and Gude, 2008). Western blot analyses of CD70+ melanoma cells cultured in the presence of QA32 confirmed that the addition of this mAb activated the MAPK pathway, since an 8-fold increase in ERK1 and ERK2 phosphorylation was observed in LB1319-MEL cells (Figure 5C) and a 3-fold increase in MEK1 phosphorylation was observed in LB39-MEL cells (Supplemental Figure 3A). Furthermore, in a 3D spheroid model, the invasive capacity of CD70+ melanoma cells was enhanced by QA32 and was reduced in the presence of the MEK inhibitor U0126 (Figures 5D and E). These results show that in melanoma cells the trimeric form of CD70, unlike the monomeric form, positively regulates the pro-invasive and pro-metastatic MAPK pathway, and that it exerts its action upstream of MEK since melanoma cell invasion was reduced in the presence of both QA32 and the U0126 inhibitor. In addition, this trimeric CD70-induced MAPK pathway up-regulation is independent of the BRAFV600E mutation since it was observed in LB39-MEL cells with BRAFV600E mutation (Supplemental Figure 3A) and in LB1319-MEL cells without the BRAFV600E mutation (Figures 5A and 5B).

Cell invasion is also influenced by the actin cytoskeleton and by focal adhesions, both of which are essential for cell movement and are regulated by several Rho GTPases. RhoA, B, and C positively regulate the cytoskeleton via multiple effectors, including the Rho kinases ROCK1/2 (Vega and Ridley, 2008), whereas RhoE (Rnd3) antagonizes Rho/ROCK signalling and disrupts stress fibres and focal adhesions (Chardin, 2006). Consequently, RhoE can promote tumour invasion through its effect on the actin cytoskeleton. In human melanoma cells, it has been shown that BRAF controls RhoE activity and that, when BRAF is inhibited, RhoE activity is also decreased, leading to an enhanced number of stress fibres and focal adhesions, and therefore decreased cell invasion (Klein et al., 2008). Therefore we evaluated the effect of QA32 binding to CD70+ melanoma cells on RhoE, ROCK1/2, stress fibres and focal adhesions. Results show a 2-fold up-regulation in RhoE overall levels (Figure 5C and Supplemental Figure 3A). As expected, a dramatic decrease in stress fibres and focal adhesions was also detected in LB1319-MEL cells after both 24h (Supplemental Figure 3C) and 48h of culture (Figure 5F). Similar results were obtained with LB39-MEL CD70+ cells (data not shown). However, ROCK1/2 inhibition was not detected (Supplemental Figure 3B), suggesting either that another Rho-effector was involved or that our experimental conditions and kinetics did not allow visualisation of ROCK1/2 inhibition.

These findings reveal that in melanoma cells, the presence of cytosolic monomeric CD70 correlates with poor invasion and metastatic capacities, whereas the binding of the anti-CD70 mAb QA32 enhances the level of trimeric CD70, which activates the MAPK/RhoE signalling pathway leading to a reduction in stress fibres and focal adhesions, in turn enhancing melanoma invasiveness.

## Discussion

This work has described that CD70 is expressed in human melanoma cells, that its expression is reduced in metastases and that its role in regulating melanoma invasion and metastasis is independent of the tumour immune microenvironment. Since an increased metastatic potential is associated with both the decreased levels of cytosolic monomeric CD70 and CD70 silencing, melanoma-expressed CD70 could become a useful prognostic marker.

CD70 expression has already been reported in renal cell carcinomas, glioblastomas, astrocytomas and ovarian cancers. In addition, Ryan *et al.* (Ryan *et al.*, 2010) previously reported that 16% of melanoma samples expressed CD70, although they did not describe the metastatic status of their sample. Here we describe CD70 expression both in human melanoma cell lines and in tumour cells from melanoma biopsies. Furthermore we analysed primary and metastatic tumour samples separately, which has allowed us to show that the number of CD70+ cells and the level of CD70 expression are significantly decreased in metastases. This loss of CD70 expression during disease progression was explained by our *in vitro* experiments which showed that CD70+ melanoma cells have a reduced capacity to migrate and invade, meaning they presumably had a limited ability for implantation of lung metastases.

The observation that CD70+ melanoma cell invasion is reduced *in vitro* in the absence of a tumour immune microenvironment has proven that this effect is intrinsic within the CD70+ tumour cells. In order to try to explain this we tested whether CD70-induced inhibition of invasion could be due to interactions between melanoma cells expressing the CD70 ligand with melanoma cells expressing its receptor CD27. This hypothesis was excluded because we could detect no melanoma cells expressing CD27, and expression was not induced by anti-CD70 mAb binding (Supplemental Figure 4).

We found that monomeric melanoma-expressed CD70 limits tumour cell migration and invasion but the trimeric form, induced by anti-CD70 mAb binding, restores these activities via MAPK activation, RhoE overexpression and stress fibre and focal adhesion inhibition. Thus, the trimeric form modulates the activation of the MAPK pathway, which is frequently mutated in melanomas and which is targeted by several pharmacological inhibitors used in the chemotherapy of metastatic melanoma. In this study we genotyped the melanoma cell lines to test for the presence of the BRAFV600E mutation which is frequent in melanomas. Our data showed that this mutation was not correlated with CD70 expression. Therefore, the use of BRAFV600E inhibitors such as Vemurafenib or Dabrafenib to treat metastatic



melanoma patients would not affect CD70 expression and signalling in melanoma cells. Furthermore a link between NRAS and CD70 expression was also excluded because we did not find any evidence of mutated NRAS among our melanoma cell lines.

Finally our data suggest that anti-CD70 antibodies, which are currently considered as promising molecules to treat human malignancies (Grewal, 2008), should be carefully selected to eliminate those that promote tumour invasion and metastasis.

## Acknowledgements

The authors thank Pr. M. Lopez-Botet for providing the anti-CD70 QA32 hybridoma and Pr. T. Boon for the human melanoma cell lines. This work was supported by INSERM and Institut Claudius Regaud and by grants from Ligue Contre le Cancer, Association pour la Recherche Contre le Cancer and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## References

- Ades, F. & Metzger-Filho, O. (2012). Targeting the Cellular Signaling: BRAF Inhibition and Beyond for the Treatment of Metastatic Malignant Melanoma. *Dermatol Res Pract*, **2012**, 259170, doi:10.1155/2012/259170.
- Chardin, P. (2006). Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 54-62, doi:10.1038/nrm1788.
- Chiari, R., Hames, G., Stroobant, V., Texier, C., Maillere, B., Boon, T. & Coulie, P. G. (2000). Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res*, **60**, 4855-4863,
- Cormary, C., Hiver, E., Mariame, B., Favre, G. & Tilkin-Mariame, A. F. (2005). Coexpression of CD40L and CD70 by semiallogenic tumor cells induces anti-tumor immunity. *Cancer Gene Ther*, **12**, 963-972, doi:10.1038/sj.cgt.7700861.
- Denoeud, J. & Moser, M. (2011). Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *J Leukoc Biol*, **89**, 195-203, doi:10.1189/jlb.0610351.
- Dua, P. & Gude, R. P. (2008). Pentoxifylline impedes migration in B16F10 melanoma by modulating Rho GTPase activity and actin organisation. *Eur J Cancer*, **44**, 1587-1595, doi:10.1016/j.ejca.2008.04.009.
- Garcia, P., De Heredia, A. B., Bellon, T., Carpio, E., Llano, M., Caparros, E., Aparicio, P. & Lopez-Botet, M. (2004). Signalling via CD70, a member of the TNF family, regulates T cell functions. *J Leukoc Biol*, **76**, 263-270, doi:10.1189/jlb.1003508.
- Grewal, I. S. (2008). CD70 as a therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets*, **12**, 341-351, doi:10.1517/14728222.12.3.341.
- Klein, R. M. & Aplin, A. E. (2009). Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res*, **69**, 2224-2233, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3201.
- Klein, R. M., Spofford, L. S., Abel, E. V., Ortiz, A. & Aplin, A. E. (2008). B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol Biol Cell*, **19**, 498-508, doi:10.1091/mbc.E07-09-0895.
- Liang, S., Sharma, A., Peng, H. H., Robertson, G. & Dong, C. (2007). Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoediting of leukocyte functions and melanoma extravasation. *Cancer Res*, **67**, 5814-5820, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4233.

- Pages, C., Rochaix, P., Al Saati, T., Valmary-Degano, S., Boulinguez, S., Launay, F., Carle, P., Lauwers, F., Payoux, P., Le Guellec, S., Brousset, P. & Lamant, L. (2008). KBA.62: a useful marker for primary and metastatic melanomas. *Hum Pathol*, **39**, 1136-1142, doi:10.1016/j.humpath.2007.12.006.
- Park, G. B., Kim, Y. S., Lee, H. K., Song, H., Cho, D. H., Lee, W. J. & Hur, D. Y. (2010). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of EBV-transformed B cells by cross-linking of CD70 is dependent upon generation of reactive oxygen species and activation of p38 MAPK and JNK pathway. *J Immunol*, **185**, 7274-7284, doi:10.4049/jimmunol.1001547.
- Riou, P., Villalonga, P. & Ridley, A. J. (2010). Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays*, **32**, 986-992, doi:10.1002/bies.201000060.
- Ryan, M. C., Kostner, H., Gordon, K. A., Duniho, S., Sutherland, M. K., Yu, C., Kim, K. M., Nesterova, A., Anderson, M., Mcearchern, J. A., Law, C. L. & Smith, L. M. (2010). Targeting pancreatic and ovarian carcinomas using the auristatin-based anti-CD70 antibody-drug conjugate SGN-75. *Br J Cancer*, **103**, 676-684, doi:10.1038/sj.bjc.6605816.
- Tilkin-Mariame, A. F., Cormary, C., Ferro, N., Sarrabayrouse, G., Lajoie-Mazenc, I., Faye, J. C. & Favre, G. (2005). Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. *FASEB J*, **19**, 1513-1515, doi:10.1096/fj.04-3482fje.
- Vega, F. M. & Ridley, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, **582**, 2093-2101, doi:10.1016/j.febslet.2008.04.039.
- Wischhusen, J., Jung, G., Radovanovic, I., Beier, C., Steinbach, J. P., Rimmer, A., Huang, H., Schulz, J. B., Ohgaki, H., Aguzzi, A., Rammensee, H. G. & Weller, M. (2002). Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma. *Cancer Res*, **62**, 2592-2599,

## Titles and legends to figures

### **Figure 1. CD70 ectopic expression in human melanomas.**

Representative images of CD70 expression after staining by IHC paraffin embedded melanoma human biopsies with anti-CD70 QA32 mAb (A) or staining of cryostat sections of frozen melanoma tumour specimens with anti-CD70 mAb clone Ki-24 (B). Negative staining corresponded to CD70 expression in less than 2% of melanoma cells, moderate staining in 2 to 20% and strong staining in more than 20%. Three slides of the same melanoma fragment showing that CD70 expression is in the tumour cells. The first slide was labelled with anti-CD70 QA32 mAb revealed by Fast Red and the two other slides were stained with anti-tumour antibodies: anti-MelanA or anti-KBA.62 revealed by HRP/DAB (C). Primary human melanomas contain more CD70+ tumour cells than metastases as quantified in paraffin embedded melanoma biopsies (D). The intensity of CD70 expression is also stronger in primary melanomas than in metastases (E). P-values (D, E) were evaluated using the Tukey ANOVA test.

### **Figure 2. CD70 expression decreases with time and disease progression in human melanomas.**

CD70 membrane expression measured by flow cytometry in three representative melanoma cell lines: LB1319-MEL, LB39-MEL and CD70+ (red) versus CD70- (blue) clones selected from LB39-MEL cell line (A). Decrease of membrane CD70 expression in three melanoma cell lines derived from the same patient (LB33-MEL) at different times and from different localizations: LB33-MEL.A (coetaneous metastasis, 1988), LB33-MEL.B (lymph node metastasis, 1993) and LB33-MEL.D (intestinal metastasis, 1999) (B). Decrease with disease progression of melanoma-expressed CD70, detected by IHC, in primitive, skin and lymph node metastases from the same patient: C121084 (C). Monomeric (CD70 M) and trimeric (CD70 T) forms of CD70 detected by western blot in LB1319-MEL (total, cytosolic and membrane fractions), B16F10-wt and B16F10-CD70 cells (D).

### **Figure 3. CD70 expression is associated with decreased in vivo metastatic capacity.**

C57BL/6, C57BL/6 IFN- $\gamma$  KO and nu/nu mice were i.v. injected with B16F10-wt (blue) or B16F10-CD70 (red) cells and pulmonary metastases were quantified, showing that B16F10-CD70 cells induced less metastases implantations (A). Representative lung photomicrographs (left) and enlargement of metastatic areas (right) of C57BL/6 mice i.v. injected with B16F10-wt (top) or B16F10-CD70 (bottom) cells. Arrows indicate metastases (B). CD70 silencing in LB1319-MEL cells transfected with siCD70 versus siCtrl as detected by flow cytometry for membrane CD70 expression (C). NMRI nu/nu mice were i.v. injected with LB1319-MEL cells (WT), LB1319-MEL cells transfected with siCD70 (siCD70) or LB1319-MEL cells transfected with siCtrl (siCtrl) and pulmonary metastases were quantified and detected only in the lung of mice injected with LB1319-

MELsiCD70 cells (**D**). Representative lung photomicrographs of nu/nu mice i.v. injected with LB1319-MELsiCtrl cells (left) or with LB1319-MELsiCD70 cells (right) where a metastasis is shown (**E**). P-values (A, D) were evaluated using the Tukey ANOVA test.

**Figure 4. In melanoma cells CD70 expression is associated with decreased *in vitro* migration and invasion capacities.**

Decreased *in vitro* migration (**A**) and invasion (**B**) capacities of B16F10-CD70+ melanoma cells analysed using transwell dishes for migration and invasion chambers for invasion with B16F10-wt (blue) versus B16F10-CD70 (red) cells. In the upper chamber the medium was or not (NT) supplemented with Ctrl Ig (Ct) or anti-CD70 mAb QA32 (QA). The number of B16F10-wt cells in the lower chamber in presence of Ctrl Ig was considered as 100%. Decreased *in vitro* migration capacity of B16F10-CD70+ melanoma cells analysed by wound-healing experiments done with B16F10-wt (blue/bottom) and B16F10-CD70 (red/top) cells (**C**). Decreased *in vitro* migration (**D**) and invasion (**E**) capacities of CD70+ human melanoma cells analysed using transwell dishes for migration and invasion chambers for invasion with LB39-MEL CD70- clone (blue), LB39-MEL CD70+ clone (red) and LB1319-MEL cells (black). In the upper chamber the medium was supplemented with Ctrl Ig (Ct) or anti-CD70 mAb QA32 (QA). The number of LB39-MEL CD70- cells in the lower chamber in presence of Ctrl Ig was considered as 100%. Results (A, B, D, E) are expressed as mean values (n=7). P-values were evaluated using the Tukey ANOVA test.

**Figure 5. CD70 signalling modulates MAPK activation, RhoE expression and cytoskeleton formation.**

Western blot analysis (**A**) and quantification (**B**) in arbitrary units (A.U.) of monomeric CD70 (CD70 M) decrease and trimeric CD70 (CD70 T) increase in LB1319-MEL cells incubated with QA32 mAb (QA). Controls are untreated (NT) and Ctrl Ig (Ct) incubated LB1319-MEL cells. Western blots analyses of the MEK/ERK pathway activation and RhoE overexpression in LB1319-MEL cells after 48 h incubation with anti-CD70 QA32 mAb (QA). Controls are untreated (NT) and Ctrl Ig (Ct) incubated LB1319-MEL cells (**C**). 3D invasion using LB1319-MEL spheroids treated with Ctrl Ig or QA32 mAb and with or without MEK inhibitor U0126, showing QA32-induced invasion enhancement and U0126-induced invasion inhibition (**D**). Quantification of spheroid areas in three different experiments is shown in (**E**). Disappearance of actin stress fibbers (Actin) and focal adhesions (Vinculin) in LB1319-MEL cells treated with QA32 mAb for 48 h. Control cells were incubated with Ctrl Ig (**F**). Results (B, E) are expressed as mean values (n=3). P-values were evaluated using the Tukey ANOVA test.

## Supplemental DATA

### Supplemental Material and Methods

#### *Subcutaneous tumour growth*

C57BL/6 mice (-wt or -IFN- $\gamma$  KO) and NMRI nude mice were injected s.c. with B16F10-wt or B16F10-CD70 cells ( $1 \times 10^5$ ). Tumour surfaces were measured every 2-3 days using digital caliper. Two groups of 6 mice were tested and the experiment was done twice. Results are expressed as surface  $\pm$ SD (error bars,  $n=6$  mice). Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA test.

### Supplementary Figures legends

#### Supplementary figure 1

##### *Absence of CD70 expression in normal skin*

Analysis in normal skin of CD70 expression by IHC with anti-CD70 QA32 mAb revealed using Fast Red.

#### Supplementary figure 2

##### *Melanoma-expressed CD70 is not associated with decreased in vivo subcutaneous tumour growth*

B16F10-CD70 and B16F10-wt tumours grew locally at similar rates as observed in immunocompetent and immunocompromised mice. C57BL/6, C57BL/6 IFN- $\gamma$ KO and NMRI nu/nu mice were injected s.c. with B16F10-wt cells (blue) or B16F10-CD70 cells (red) and local tumour growth was measured. Results are expressed as mean values ( $n=6$ ). Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA test.

#### Supplementary figure 3

##### *QA32 binding on CD70+ melanoma cells induced MEK1 phosphorylation, RhoE overexpression and stress fibbers and focal adhesions inhibition but no detectable modification in ROCK1/2*

(A) Western blot analysis of P-MEK1 and RhoE overexpression in LB39-MEL CD70+ cells after 48 h incubation with QA32 mAb (QA). MEK1 expression and LB39-MEL CD70+ cells incubated alone (NT) or with Ctrl Ig (Ct) were used as controls. (B) Unchanged ROCK1 and ROCK2 expression in LB1319-MEL cells after 48 h incubation with QA32 mAb (QA) compared to Ctrl Ig (Ct) as detected by western blot analysis. (C) Disappearance of actin stress fibbers (Actin) and focal adhesions (Vinculin) in LB1319-MEL cells treated with QA32 mAb for 24 h. Control cells were incubated with Ctrl Ig.

**Supplementary figure 4**

**Absence of CD27 expression in human melanoma cells spontaneously or after anti-CD70 mAb binding**

CD27 membrane expression was measured by flow cytometry in two CD70+ melanoma cell lines: LB1319-MEL and LB39-MEL CD70+, which were CD27 negative and remained negative after binding of Ctrl Ig or anti-CD70 mAb.

Figure 1

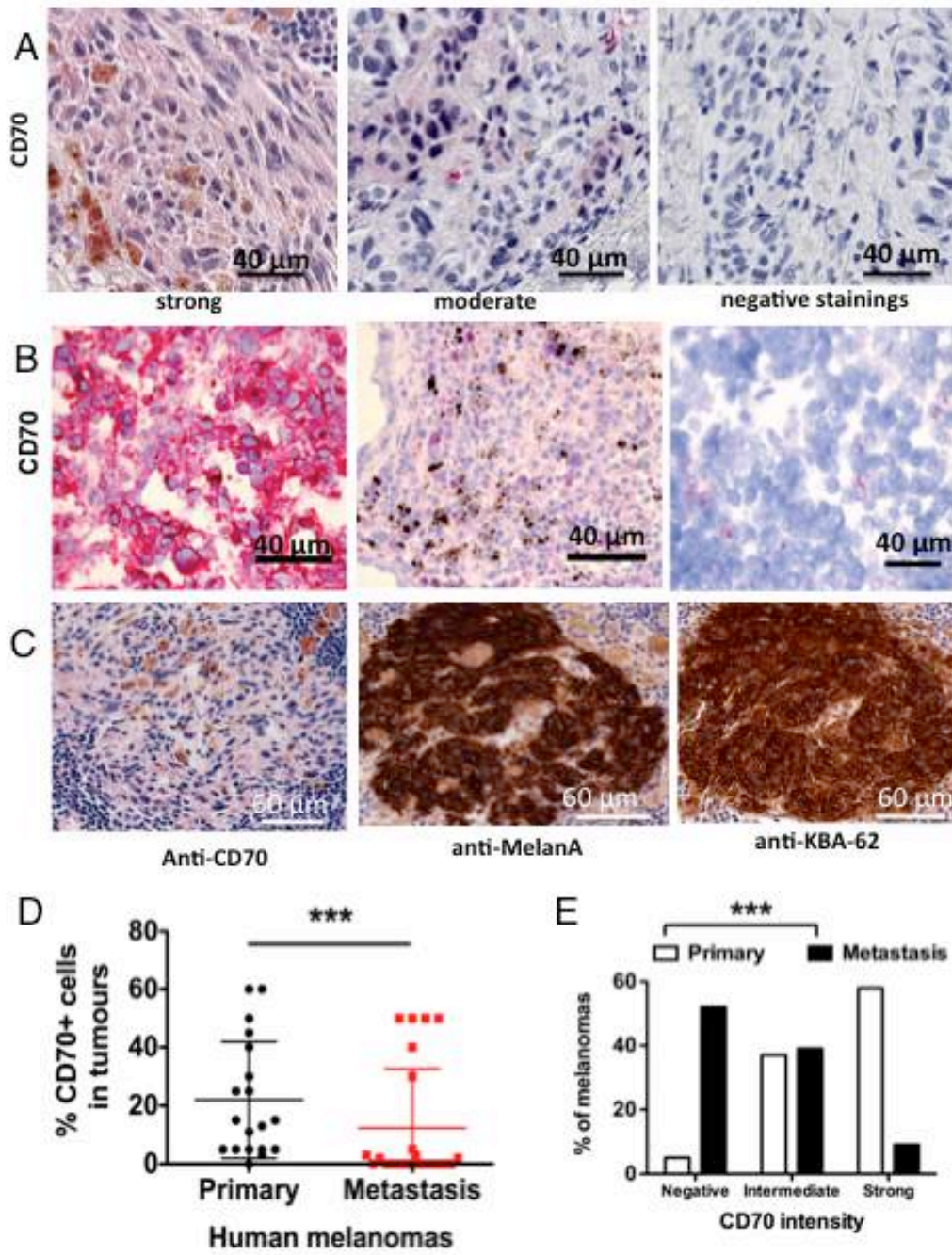


Figure 2

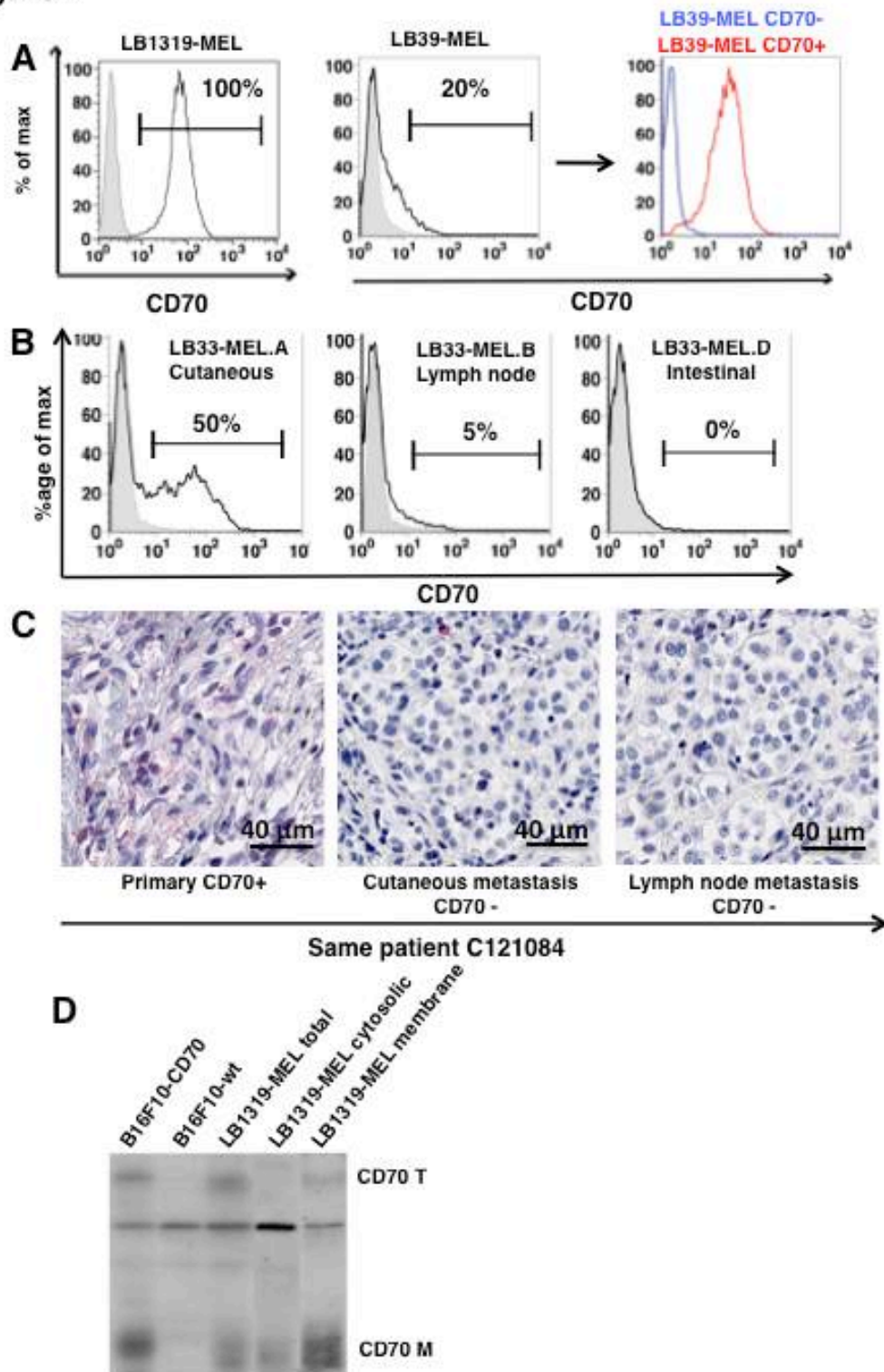




Figure 3

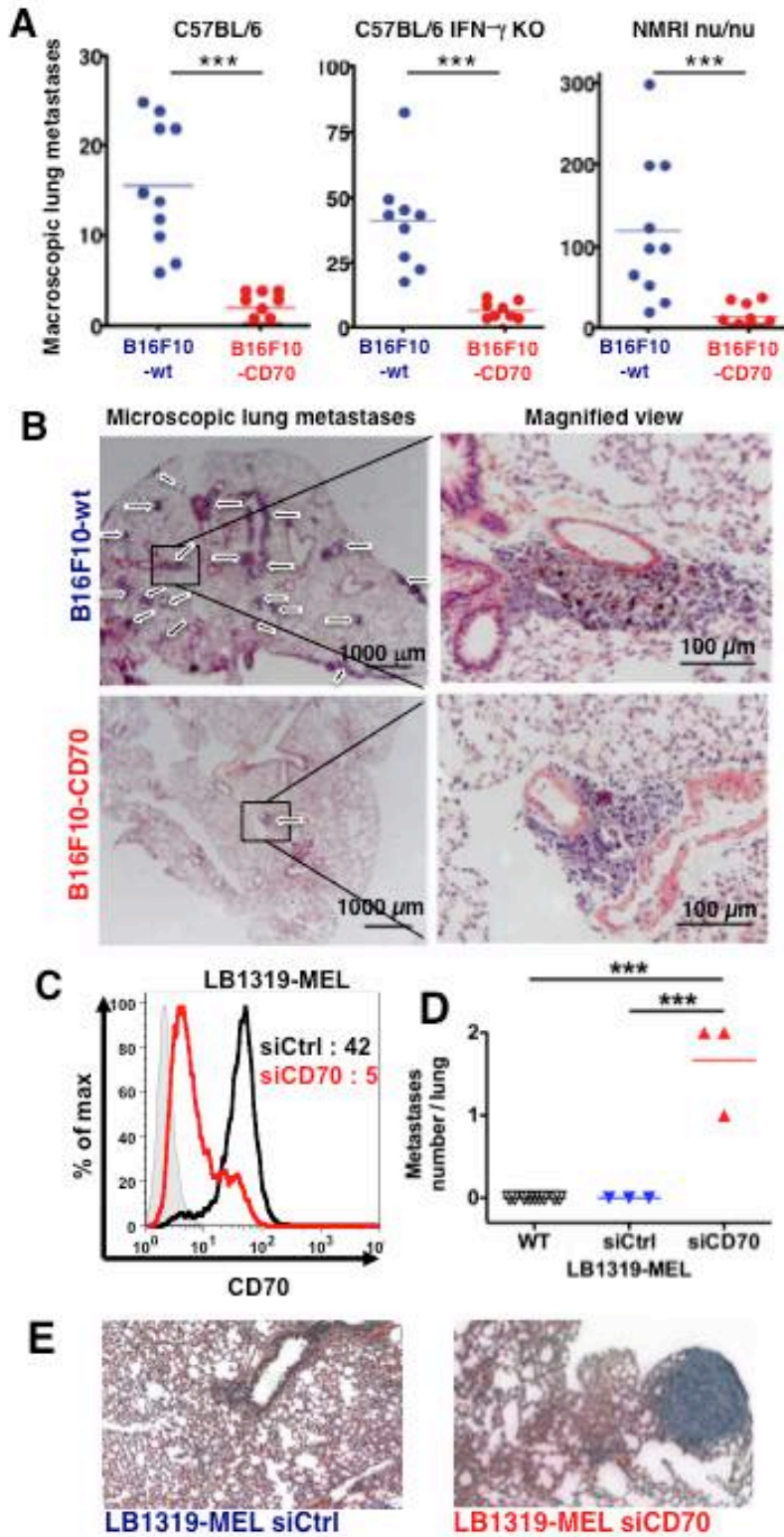


Figure 4

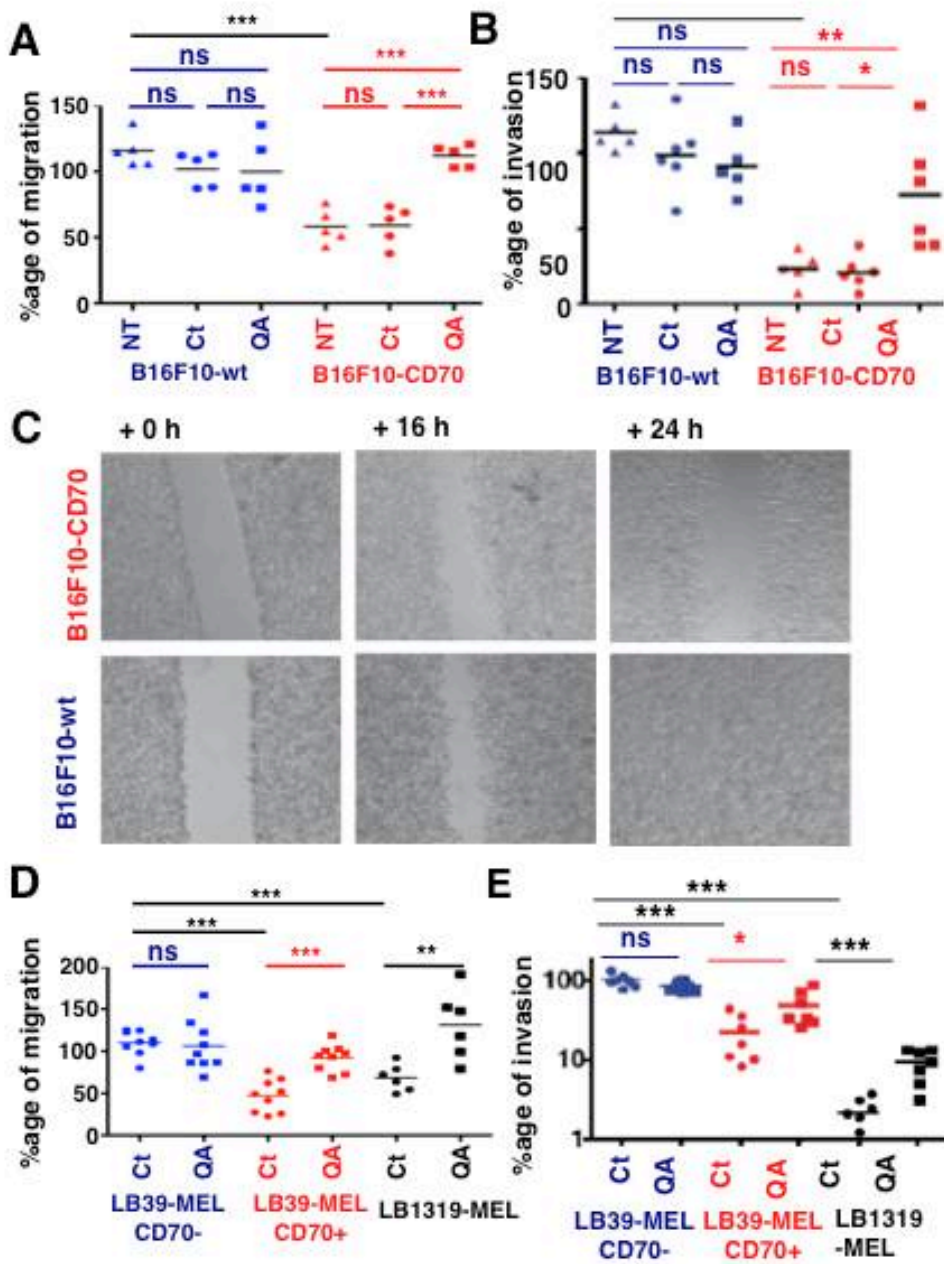
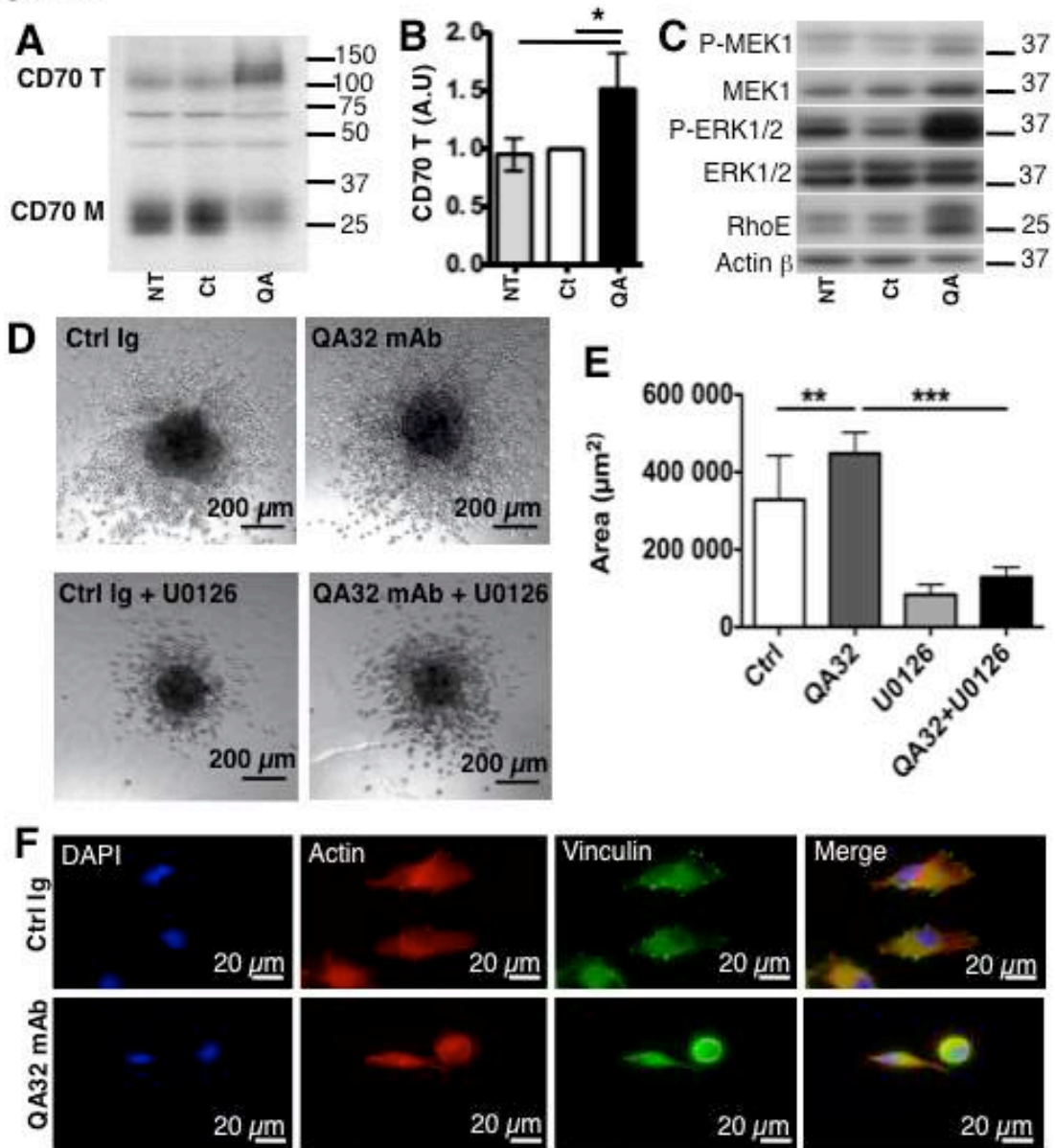
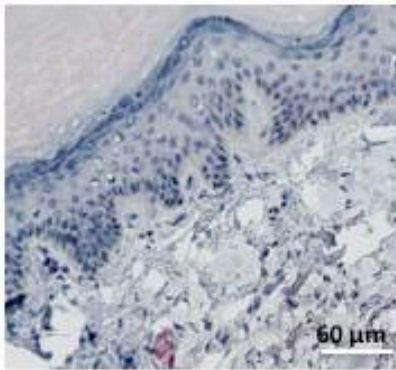


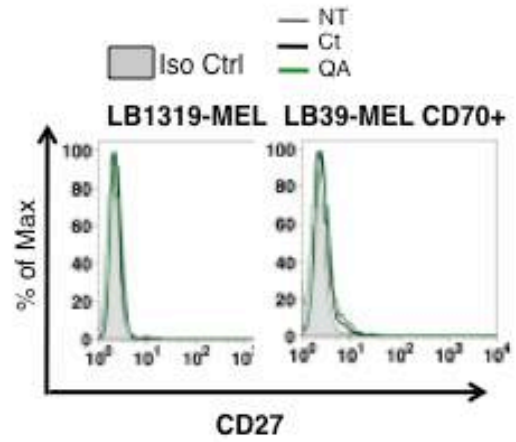
Figure 5



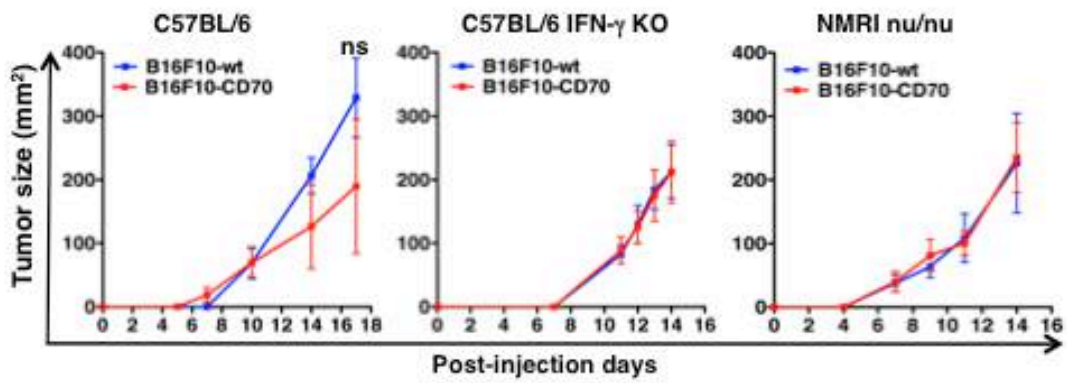
**Supplementary Figure 1**



**Supplementary Figure 4**

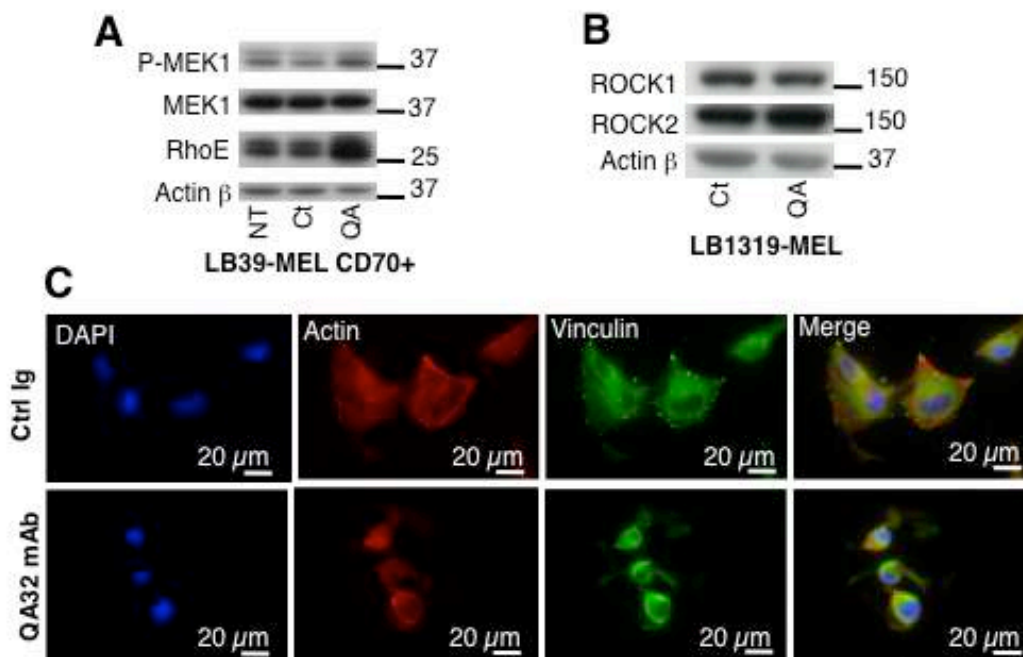


**Supplementary Figure 2**



@

**Supplementary Figure 3**



## Résultats IV

### Melanoma expressed-CD70 is regulated by RhoA and MAPK pathways without affecting Vemurafenib treatment activity

Christine Pich <sup>\*</sup>, **Iotefa Teiti**<sup>\*</sup>, Guillaume Sarrabayrouse, Franck Gallardo, Philippe Rochaix, Gilles Favre, and Anne-Françoise Tilkin-Mariamé.

*\* Les co-premiers auteurs ont contribué de façon égale à ce travail*

#### Article soumis à Plos One

Le mélanome est la forme de cancer cutané la plus agressive et son incidence est en constante progression ces dernières années (Belot et al, 2008). Cette agressivité est surtout caractérisée par le fait que peu de traitements actuels sont efficaces lorsque les malades ont développé des métastases (Eggermont et al, 2013). Un traitement par chimiothérapie prometteur repose sur l'inhibition spécifique de la protéine BRAF mutée en position V600E par le Vémurafénib (PLX-4032). Cette mutation BRAFV600E est retrouvée dans 50% des mélanomes. Elle active la protéine BRAF, appartenant à la voie des MAPK, de façon constitutive. Cette voie est essentielle pour diverses fonctions cellulaires comme la prolifération cellulaire ou encore l'invasion (Chapman et al, 2011; Gray-Schopfer et al, 2007).

Nous avons récemment mis en évidence l'expression ectopique de CD70 sur un panel de biopsies et plusieurs lignées de mélanome. CD70 est une molécule de costimulation appartenant à la famille du TNF. CD70 est exprimé sur les cellules immunes activées et participe à leur fonction cytotoxique et mémoire (Denoeud & Moser, 2011). Son expression ectopique a aussi été retrouvée dans d'autres types de tumeurs solides comme les carcinomes rénaux, les cancers du sein ou les glioblastomes (Diegmann et al, 2006; Petrau et al, 2014; Wischhusen et al, 2002). Nos récents travaux ont montré que l'expression de CD70 sous forme monomérique limite les capacités migratrices et invasives des cellules de mélanome. A l'inverse, la trimérisation de CD70 active une signalisation MAPK/RhoE/fibres de stress favorisant l'invasion de ces cellules tumorales.

Au cours des travaux présentés ci-dessous, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression de CD70 sur différentes lignées de mélanome. Nous montrons que RhoA et la voie des MAPK régulent positivement l'expression de CD70 sur les mélanomes et ceci de façon dépendante et non additive.

Nous avons déterminé par cytométrie en flux que l'expression membranaire de CD70 sur trois lignées de mélanomes humains, LB1319-MEL, LB39-MEL CD70+ et WM-266-4, est régulée positivement



par la GTPase RhoA. Des expériences de RT-qPCR, de Western-Blot et l'analyse de l'activité du promoteur de CD70 par luminescence révèlent que cette régulation se fait au niveau transcriptionnel et traductionnel.

Néanmoins, l'inhibition de la GTPase RhoA n'éteint pas complètement l'expression de CD70. Nous avons alors étudié l'implication d'une autre voie importante dans la progression des mélanomes : la voie des MAPK (BRAF/MEK/ERK). En inhibant cette voie des MAPK avec un inhibiteur spécifique de MEK (U0126), nous montrons qu'elle régule positivement la transcription de CD70 dans les cellules de mélanome LB1319-MEL. Cette régulation positive de CD70 par la voie des MAPK est aussi retrouvée dans deux autres lignées de mélanomes CD70+ : LB39-MEL CD70+ et WM-266-4. De plus, en inhibant BRAF par ARN interférence et par inhibition pharmacologique ciblée de la mutation BRAF V600E avec le Vémurafénib, nous démontrons que BRAF régule positivement CD70 mais ceci indépendamment de la mutation V600E. Ces résultats confirment l'implication de la voie MAPK (BRAF/MEK/ERK) dans la régulation positive de CD70 dans les mélanomes.

Nous avons alors cherché à savoir si les régulations de l'expression de CD70 par RhoA et la voie MAPK sont liées. Pour cela, nous avons analysé l'expression et l'activation de RhoA sous inhibition de la voie des MAPK et inversement l'expression et l'activation de ERK après inhibition de RhoA. Nous avons déterminé que ces deux voies de régulation de CD70 sont liées. De plus, lors de l'inhibition simultanée des voies RhoA et MAPK, nous avons observé que l'expression membranaire de CD70 n'était pas significativement diminuée par rapport à l'inhibition seule de chacune des deux voies.

Enfin, nous montrons que l'expression de CD70 dans les cellules de mélanome n'interfère pas avec l'activité du Vémurafénib.

En conclusion, nos expériences mettent en évidence l'implication de RhoA et de la voie MAPK (BRAF/MEK/ERK) dans une régulation transcriptionnelle de l'expression de CD70 dans les mélanomes. De plus, nos expériences montrent que ces régulations par RhoA et les MAPK sont indépendantes et additionnelles, que l'expression de CD70 sur les mélanomes n'interfère pas avec leur sensibilité à l'inhibition par le Vémurafénib.

## **Melanoma-expressed CD70 is regulated by RhoA and the MAPK pathway without affecting Vemurafenib treatment activity**

Christine Pich<sup>1,2,a</sup>, Iotefa Teiti<sup>1,2,a</sup>, Guillaume Sarrabayrouse<sup>1,2</sup>, Franck Gallardo<sup>4</sup>, Rémi Gence<sup>1,2</sup>, Philippe Rochaix<sup>2,3</sup>, Gilles Favre<sup>1,2,3</sup>, and Anne-Françoise Tilkin-Mariamé<sup>1,2</sup>.

<sup>a</sup> contributed equally to this work.

<sup>1</sup> Unité INSERM UMR 1037, CRCT, Toulouse F-31037, France

<sup>2</sup> Université Paul Sabatier, Toulouse F-31062, France

<sup>3</sup> Institut Universitaire du Cancer - IUCT, Toulouse F-31059, France

<sup>4</sup> NeoVirTech, Institut des Sciences du vivant, Toulouse F-31106, France

**Corresponding author:** Tilkin-Mariamé A-F<sup>1,2</sup> INSERM U1037 - Université Toulouse 3 -

ERL5294 CNRS, 2 avenue Hubert Curien, 31037 TOULOUSE - FRANCE

E-mail: anne-francoise.tilkin@inserm.fr

**Short Title:** CD70 regulation in melanoma cells

**Keywords:** Melanoma, CD70, MAPK, BRAF, RhoA, Vemurafenib

## ***Abstract***

CD70 is a costimulatory molecule and member of the Tumor Necrosis Factor family that is expressed on activated immune cells. Its ectopic expression has been described in several types of cancer cells, including lymphomas, renal cell carcinomas and glioblastomas. We recently described its expression in a part of tumor cells from the vast majority of melanoma biopsies and human melanoma cell lines, and found that CD70 expression decreased over time as the disease progressed. Here, we show that RhoA and the Mitogen Activating Protein Kinase (MAPK) pathway are involved in the positive transcriptional regulation of CD70 expression in melanomas. Interestingly, the clinical inhibitor of the common BRAFV600E variant, Vemurafenib (PLX-4032), which is currently used to treat melanoma patients with BRAFV600E-mutated metastatic melanomas, decreased CD70 expression in human CD70+ melanoma cell lines. This decrease was seen in melanoma cells both with and without the BRAFV600E mutation, although was less efficient in those lacking the mutation. But interestingly, by silencing CD70 in CD70+ melanoma cell lines we show that PLX-4032-induced melanoma cell killing and its inhibitory effect on MAPK pathway activation are unaffected by CD70 expression.

## ***Introduction***

Malignant melanomas are the most aggressive form of skin cancers that kill affected patients through multiple metastases [1]. Mortality rates increase in the advanced stages and patient survival following metastatic detection is usually short. Melanoma progression correlates with the appearance of molecular alterations, thereby generating more malignant tumors [2,3]. Activating mutations in the serine/threonine kinase BRAF, in particular the BRAFV600E mutation, occur in about 50% of melanomas [1,4]. The BRAFV600E mutation induces activation of the MAPK pathway, which is involved in essential cellular processes such as proliferation, differentiation and particularly invasion, suggesting a strong relationship between the mutation and metastatic potential. PLX-4032 (also known as Vemurafenib) is a BRAFV600E-specific inhibitor. Preclinical studies have indicated that PLX-4032 blocks the mutated BRAF protein, triggering rapid cell growth arrest and cell death in tumors carrying this mutation [5]. Recent studies have shown that treatment with Vemurafenib also promotes an anti-melanoma immune response by enhancing tumor antigen expression, lymphocyte cytotoxicity and tumor infiltration by lymphocytes [6,7]. Clinical trials of Vemurafenib have shown a therapeutic effect in more than 50% of patients with BRAFV600E-positive metastatic melanoma [5,8]. Only patients with this mutation appear to benefit from treatment, but for those patients Vemurafenib treatment has been shown to improve the rates of overall and progression-free survival and is recommended for the treatment of melanomas that have spread or cannot be removed by surgery. In the clinical context, the majority of patients first respond to this inhibitor and usually metastases



uniformly regress. However, often cancer cells break out and progress again once resistance is acquired [7,8].

Recently, using patient biopsies and human melanoma cell lines, we investigated the ectopic expression of CD70 in melanoma tumor cells. CD70 is a costimulatory molecule and member of the TNF superfamily that is expressed in activated T- and B-lymphocytes. In these immune cells, CD70 is involved in priming, effector functions, differentiation, and memory formation through binding to its receptor, CD27 [9,10]. The functional form of CD70 is a membrane-expressed homotrimeric type II molecule that, upon engagement, induces trimerization of the CD27 receptor to initiate intracellular signaling [9,10]. CD70 also plays an intrinsic active role in T-lymphocyte activation. Indeed, cross-linking of CD70 with the CD70-specific mAb QA32 was shown to trigger T-cell mediated cytotoxicity, cytokine production, calcium mobilization and MAPK phosphorylation [11]. In agreement with this we have previously demonstrated that CD70-positive murine tumor cells generate an enhanced anti-tumor immune response [12].

In addition to its expression in activated lymphocytes, CD70 expression has been documented in several types of lymphomas, glioblastomas [13] and renal cell carcinomas [14]. We recently showed that CD70 was expressed in most primary melanomas and that its expression was lost over the course of melanoma progression. This study also demonstrated that melanoma-expressed CD70 is implicated in tumor migration, invasion and metastasis. Melanoma cells expressing monomeric CD70 possessed a reduced ability to migrate and invade surrounding areas, whereas the trimerization of CD70 increased the invasive potential of the melanoma through MAPK pathway activation, RhoE overexpression and inhibition of actin fibers and focal adhesions (*British J Cancer. Submitted*). Rho GTPase activity is central to melanoma cells, and indeed we have previously shown that RhoA inhibition induced the up-regulation of several immune-interacting molecules including MHC Class-I, CD80/CD86 costimulatory molecules and FasL, which like CD70 belongs to the TNF superfamily [15,16,17]. However, the correlation between Rho GTPases, MAPK pathway activation status and CD70 expression in CD70+ melanoma cells is yet to be described.

Most Rho family members act as molecular switches, cycling between a GTP-bound active form and a GDP-bound inactive form. Once activated, Rho GTPases bind to different effector molecules and trigger signaling cascades to direct essential cellular functions like cell growth, apoptosis and the cytoskeletal dynamics involved in cell motility, invasion and metastasis [18]. The three highly-related Rho isoforms RhoA, B and C share some effector proteins but show clear functional differences [19]. In this study, we investigated the roles of Rho GTPases on CD70 expression in human melanomas. In addition, we used several inhibitors of the MAPK pathway, including PLX-4032, to investigate the role of this pathway in the regulation of CD70 expressed by melanoma cells. Our results showed that RhoA and MAPK pathway cross-talk to positively regulate melanoma-expressed CD70. Interestingly this CD70 expression does not affect PLX-4032-induced inhibition of MAPK pathway activation and tumor cell cytotoxicity.

## **Results**

### **RhoA inhibition decreases CD70 expression in human melanoma cells**

Rho GTPases are involved in tumor mobility and we have previously shown that, in melanoma RhoA regulates the expression of FasL, another TNF family member. Therefore we tested for potential roles of the Rho GTPases in the regulation of CD70 expression using an siRNA strategy to reduce RhoA, RhoB, or RhoC expression in CD70+ LB1319-MEL human melanoma cells. Transfection of two RhoA-specific siRNAs (siRhoA1 and siRhoA2) significantly reduced the level of membrane-associated CD70, as detected by FACS analysis, compared to cells transfected with RhoB (siRhoB1 and siRhoB2), RhoC (siRhoC1 and siRhoC2), or control (siCtrl) siRNAs (Figures 1A and B). The efficiency of the siRNAs in decreasing their specific Rho protein was confirmed, as illustrated in Figures 1C, S1A and S1B. Accordingly, over-expression of RhoA by infection of LB1319-MEL cells with RhoA-encoding adenoviruses increased levels of membrane-associated CD70 (Figures 1D and E). Furthermore, transfection of LB1319-MEL cells with RhoA-specific siRNAs significantly reduced global CD70 expression, as detected by western blotting (Figures 1C and S1C). SiRhoA2 was the most efficient RhoA inhibitor so was used in subsequent experiments. Using RT-qPCR we found that CD70 mRNA accumulation was severely reduced after transfection with siRhoA2 compared to siCtrl (Figure 1F). To determine whether this effect was linked to a modification of the CD70 promoter activity, we used a plasmid expressing firefly luciferase (Luc) under the control of the CD70 promoter (pCD70FL reporter plasmid, described in [20]). We sequentially transfected siRhoA2 and the pCD70FL plasmid, and observed a dramatic decrease in the Luc signal, showing that RhoA positively regulated the CD70 promoter (Figure 1G).

To confirm the involvement of RhoA in the regulation of melanoma-expressed CD70, two other human CD70+ melanoma models were used, the WM-266-4 cell line and a CD70+ clone of the LB39-MEL cell line. Membrane-associated and total CD70 protein levels were decreased in these cells after RhoA-specific siRNA transfection (Figures S1D-G).

Altogether, these data show that RhoA positively controls the transcriptional levels of ectopic CD70 in human melanoma cells.

### **Inhibition of the MAPK pathway decreases CD70 expression**

We next investigated the role of the MAPK pathway in the regulation of melanoma-expressed CD70, since this pathway is involved in TNF family protein regulation [20] and is activated in many melanomas, where it plays an essential role in melanoma progression and metastasis [4,5]. Constitutive MAPK pathway activation was observed in the three CD70+ cell lines tested (LB1319-MEL, LB39-MEL CD70+ and WM-266-4), as demonstrated by western blotting which showed the presence of phosphorylated MEK and ERK even in the absence of any stimulation (Figure S2A). In

LB39-MEL CD70+ and WM-266-4 cells, MAPK pathway activation is linked to the BRAFV600E mutation, but in LB1319-MEL cells this activation is not due to this mutation since this cell line does not carry a mutation at this locus (data not shown). To investigate the role of the MAPK pathway in melanoma-expressed CD70 regulation, we used two specific pharmacological inhibitors of MEK phosphorylation (p-MEK): PD98059 (data not shown) and U0126. Melanoma cells were treated for 48h at different concentrations of U0126. Inhibition of the MAPK pathway was observed, as illustrated in both LB1319-MEL and WM-266-4 cells, by a reduction in p-MEK (Figure 2A). Down-regulation of membrane-expressed and global CD70 protein levels was observed in cells treated with both inhibitors. Figure 2B illustrates the decrease in CD70 expression in LB39-MEL CD70+ cells treated with U0126 at 5 $\mu$ M. Histograms in Figures 2C, 2D and 2E demonstrate the U0126 dose-dependent decrease in membrane-expressed CD70 in LB1319-MEL, LB39-MEL CD70+ and WM-266-4 cells. At 5 $\mu$ M, the U0126 inhibitor was less toxic than PD98059, so was used for subsequent experiments. The total amount of CD70 protein, detected by western blotting (Figures 2A and S2B), and CD70 mRNA levels, detected by RT qPCR (Figure 2F), were also reduced by U0126 treatment at 5 $\mu$ M.

These results demonstrate that MEK protein activation is involved in the positive transcriptional regulation of CD70 expression in melanomas.

### **Melanoma-expressed CD70 regulation by RhoA and the MAPK pathway**

Both RhoA and MAPK are critical components of many cellular signal transduction pathways. Hyperactivity and over-expression of RhoA and hyper-activated mutated BRAF have been observed in numerous human cancers, including melanoma [8,19]. We hypothesized, based on results from a previous study [21], firstly that in melanoma cells proteins of the MAPK pathway might be activated by RhoA or vice versa, and secondly that this cross-talk could be responsible for the regulation of CD70 expression. To test these hypotheses, MAPK pathway activation was evaluated in LB1319-MEL cells after RhoA inhibition induced by transfection with specific siRNAs (siRhoA2). Conversely, RhoA expression and activation were also evaluated following MAPK inhibition induced by treatment with the MEK phosphorylation inhibitor U0126. These results are illustrated in Figures 3A-C and show that these two pathways are linked. Indeed, inhibition of RhoA reduces MAPK activation, illustrated by a decrease in ERK phosphorylation (Figures 3A and 3B), and inhibition of the MAPK pathway severely decreased RhoA expression and activation (Figures 3C and 3D). We wondered if simultaneous RhoA and MAPK inhibition would have an additive effect on membrane-expressed CD70. LB1319-MEL cells were simultaneously transfected with siRhoA2 and treated with 5 $\mu$ M U0126. The observed membrane-associated CD70 down-regulation was not increased when compared with the individual treatments (Figure 3E), confirming that the RhoA and MAPK pathways cross-talk to regulate melanoma-expressed CD70.

### **PLX-4032 treatment and BRAF knockdown reduce melanoma-expressed CD70**

In most melanoma cases, constitutive activation of the MAPK pathway is associated with the presence of BRAFV600E mutation. PLX-4032 is a pharmacological molecule designed to inhibit the constitutive activation of the BRAFV600E mutated protein that is commonly involved in melanoma metastasis [5].

In LB39-MEL CD70+ and WM-266-4 cells MAPK pathway activation is linked to the BRAFV600E mutation (Figure S2A). The MAPK pathway is activated but to a lesser extent in LB1319-MEL cells which are not mutated in BRAFV600E. Nevertheless, the *in vitro* treatment of these three melanoma cell lines with PLX-4032 induced a decrease in both membrane-associated and global CD70 (Figures 4A-F, S3A-C). In LB1319-MEL cells, which do not contain the BRAFV600E mutation, the effect was lower and was obtained with a higher dose of PLX-4032 (Figures 4E, 4F and S3C). Since activation of the MEK/ERK pathway can also be inhibited by BRAF knockdown, we tested the involvement of BRAF in melanoma-expressed CD70 using a BRAF-specific siRNA. Transfection of LB1319-MEL cells with siBRAF significantly inhibited MAPK pathway activation, which was illustrated by a reduction in ERK phosphorylation (Figure 4G). This transfection also reduced membranous and total CD70 levels compared to cells transfected with the control siRNA (Figures 3G and 3H).

These results demonstrate that BRAF regulates CD70 expression independently of the V600E mutation and confirms that activation of the MAPK pathway positively regulates melanoma-expressed CD70. Inhibition of this pathway at either the BRAF or MEK level is able to reduce melanoma-expressed CD70.

### **Melanoma-expressed CD70 does not interfere with PLX-4032-induced inhibition of MAPK pathway activation and tumor cells cytotoxicity**

We wondered whether, in melanoma cells, CD70 expression might interfere with PLX-4032-induced inhibition of the MAPK pathway activation and killing of tumor cells. We evaluated MAPK pathway activation in CD70+ melanoma cells (LB1319-MEL and WM-266-4) after simultaneous transfection of CD70-specific siRNA and treatment with PLX-4032. The efficiency of siCD70 in decreasing CD70 expression was confirmed (Figures S4A and S4B). The inhibition of the MAPK pathway activation induced by PLX-4032 was not altered in cells transfected by siCD70 compared to control siRNA (siNeg) (Figures 5A and B).

We next investigated whether CD70 expression affects PLX-4032-induced tumor cell cytotoxicity. First we showed that siCD70 itself did not reduce *in vitro* melanoma cell proliferation (Figure S4C and S4D). We then evaluated PLX-4032 cytotoxicity on LB1319-MEL and WM-266-4 melanoma cells transfected by either siCD70 or control siNeg. The observed cell survival after 72h of PLX-4032 treatment was similar for both siCD70- and siNeg-transfected cells (Figures 5C and 5D) showing that melanoma-expressed CD70 does not interfere with PLX-4032 treatment. Therefore the efficiency of

clinical treatment of melanoma patients with Vemurafenib should not be influenced by CD70 expression in patients' tumors.

## ***Discussion***

Altogether our experiments show that the expression of CD70 in melanoma cells is under the control of RhoA and the MAPK pathway. Most primitive melanomas contain CD70-positive tumor cells, and this expression decreases during the progression of the disease and in metastasis. In melanoma cell lines the monomeric form of CD70 is associated with reduced migration, invasion and metastasis capacities, whereas the active trimeric form of CD70 induces the activation of a signaling pathway, which favors melanoma invasiveness (*Brit J Cancer*, submitted). Therefore it is not surprising that CD70 expression is tightly regulated in these tumor cells.

Using a human radial growth phase melanoma cell line (WM35), Ruth *et al.* previously showed that over-expression of RhoC promoted cell invasion by two independent pathways involving either ROCK or PI3K/Akt [22]. Here, using three other human melanoma cell lines we have shown that RhoA, rather than RhoC, controls the migration and invasive capacities of melanoma cells through its positive regulation of melanoma-expressed CD70. RhoA is a key player in many different types of cancer cells. Indeed, several different tumor models, including melanomas, have been used to implicate the RhoA GTPase in tumor growth, cell motility and metastatic development [18,23,24].

The role of the BRAF/ERK pathway on CD70 expression in melanoma cells was also investigated here because this pathway is essential in melanoma progression and metastasis [4], and because pharmacological inhibitors have a strong but often transitory efficacy against these tumors. The interactions between the MAPK pathway and CD70 are complex and form a loop of positive regulation. Indeed, we have demonstrated here that the MAPK pathway positively regulates CD70 expression in melanoma cells. We have previously shown that the enhancement of the active trimeric form of CD70, facilitated by the binding of a CD70-specific mAb, induced MAPK pathway hyperactivation, which favored melanoma cell invasion (*Brit J Cancer*, submitted). These results revealed a role for CD70 in melanoma invasiveness via its interaction with MAPK pathway activation. Linkage between the RhoA-ROCK and the BRAF-ERK-MAPK pathway has previously been described, for example in the control of osteogenic gene expression [25] and in colon adenocarcinoma cells, where it induced cell migration and invasion [26]. Here we have also shown that the interaction of melanoma-expressed CD70 with the MAPK pathway does not interfere with the inhibitory activities of PLX-4032 (Vemurafenib) on MAPK activation and melanoma cell survival. This information is essential for the clinical use of Vemurafenib, to know that presence or absence of CD70 in melanoma patient tumor cells will not affect the efficacy of Vemurafenib treatment. Consequently patients' biopsies do not need to be tested for CD70-melanoma expression, but treatment of these patients with anti-CD70 antibodies could be harmful because it could promote metastasis.

## ***Materials and Methods***

### ***Tumor cell lines***

Human melanoma cell lines: LB1319-MEL (BRAF and NRAS-wt) and LB39-MEL were kindly provided by Pr. T. Boon (Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels). We have isolated a CD70+ clone of LB39-MEL cell line (LB39-MEL CD70+, BRAFV600E and NRAS-wt) by FACS sorting and cellular cloning. WM-266-4 (BRAFV600E and NRAS-wt) cell line was obtained from ATCC. These tumor cell line cultures were maintained by serial passages in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% FCS, 1 mM glutamine, and 1% penicillin-streptomycin-amphotericinB (Lonza). Cultures were tested monthly to ensure that they were mycoplasma-free.

### ***Flow cytometry analyses***

PE-conjugated anti-CD70 mAb and isotype control were purchased from BD Biosciences. Stained cells were analyzed on a BD FACS Calibur (Becton Dickinson) and results were analyzed with FlowJo software. To evaluate CD70 membrane expression and to pool several analyses, two quantifications were used: either Fold Induction values (CD70 membrane expression FI corresponding to the normalized level of membrane-expressed CD70) were calculated compared to control conditions, or index of specific fluorescence (ISF) was calculated using the following formula: (median fluorescence intensity (MFI) with the specific antibody - MFI with the isotype control) / MFI with the isotype control x 100

### ***Western blot analyses***

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% NP-40, 1% proteases, and phosphatase inhibitor cocktail), and protein extracts were prepared by the standard procedure and then separated on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide (SDS-PAGE) gel electrophoresis (50 or 100 µg protein/lane). Proteins were blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. The filters were incubated at 4°C overnight with primary antibodies against CD70, RhoA, RhoA-GTP, RhoB, RhoC, MEK1, P-MEK1, ERK1/2 and P-ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology and Cell Signaling). Actin was used as a loading control (Chemicon, Merck Millipore). The Hybond-p membranes (GE Healthcare) were then incubated with HRP-labeled secondary antibody (R&D System and Cell Signaling) for 1 h at room temperature and then detected with a chemiluminescence detection ECL kit (Thermo Scientific Pierce). Band intensities were quantified using ImageJ software (National Institute of Health, USA).

***Transfection of siRNAs and transduction with adenoviral vectors***

Cells were transiently transfected with siRNAs, as previously described [15]. Briefly, melanoma cells ( $5 \times 10^5$ ) were transfected with 20 nM siRNA using JetPrime (Polyplus Transfection). The following siRNA duplexes, purchased from Eurogentec, were used: siRhoA1 (GAAGUCAAGCAUUUCUGUC-*TT*); siRhoA2 (GCAGGUAGAGUUGGCUUUG-*TT*); siRhoB1 (CUAUGUGGGCCGACAUUGAG-*TT*); siRhoB2 (CCGUCUUCGAGAACUAUGU-*TT*); siRhoC1 (UAAGAAGGACCUGAGGCAA-*TT*); siRhoC2 (GACUAUGAUCGACUGCGGC-*TT*); a non-targeting siControl (siCtrl) (GACGUGGGACUGAAGGGGU-*TT*). The following siRNA duplexes, purchases from Thermo Fisher, were used: siCD70 pool (CACCAAGGUUGUACCAUUG , GCAUCUACAUGGUACACAU , GCAGCUGAAUCACACAGGA , UGACCACUGCUGCUGAUUA) and a non-targeting siNegative pool (siNeg) (UGGUUUACAUGUCGACUAA , UGGUUUACAUGUUGUGUGA , UGGUUUACAUGUUUCUGA , UGGUUUACAUGUUUCCUA).

Cells ( $6 \times 10^5$ ) were transiently transduced with adenoviral vectors at a multiplicity of infection of 50:1 for 36h. Adenoviral vectors expressing RhoA (AdRhoA) under the transcriptional control of CMV promoter were constructed with the AdEasy System (MP Biomedical), according to the manufacturer's instructions.

***Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)***

Total RNA was isolated using the RNeasy kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions, then reverse-transcribed using the iScript cDNA synthesis kit (BioRad). Quantitative real-time PCR was performed with an iQreal-time PCR detection system (BioRad) using iQ SYBR Green Supermix (BioRad).

***Luciferase assays***

The pCD70-FLuc plasmid reporting CD70 promoter activity with Firefly Luciferase (FLuc) was kindly given by Dr. B. Richardson (University of Michigan, Ann Arbor, MI) [20]. The pCMV-RLuc plasmid expressing Renilla Luciferase (RLuc) was co-transfected as an internal control. Cells were first transfected with siRhoA2 for 48 h, as described above. Cells were then plated in 24-well plates and transiently transfected with pCD70-FLuc and pCMV-RLuc plasmids using JetPEI (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours after plasmid transfection, luciferase activities were measured using the Dual Luciferase Assay System (Promega).

***GST pull-down assay***

The level of activated RhoA and GTP-bound RhoA protein was measured using the GST fusion protein containing the Rho binding domain of Rhotekin [27]. The amount of GTP- bound RhoA and the total amount of RhoA in cell lysates were determined by western blot as described above [28].

### **Immunofluorescence**

Untreated and treated cells were fixed and processed for immunofluorescence directed against CD70 using CytoFix/CytoPerm (BD Pharmingen) according manufacturers' instructions, and stained for 45 min with PE-conjugated anti-CD70 mAb and isotype control (BD Pharmingen). CD70 expression based on immunofluorescence signal was quantified using Arrayscan VTi high content microscope (Thermo Scientific cellomics).

### ***In vitro proliferation***

LB1319-MEL and WM-266-4 melanoma cells were transfected with siNeg or siCD70. Then cells were plated at  $1 \times 10^4$  cells and treated with 1  $\mu$ M of PLX-4032. 72 h after treatment, cells were counted using Coulter Counter (Beckman Coulter).

### ***Statistical analysis***

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Significance of RT-qPCR and CD70 promoter activity were assessed by t-test. Significance of flow cytometry and western blot analyses were assessed by t-test or Tukey one-way ANOVA test. All statistic tests were two-sides. The values are expressed as means  $\pm$  95% confidence interval (CI) in the figures. *P* values less than .05 were considered statistically significant.

### ***Acknowledgements***

The authors thank Pr. M. Lopez-Botet for providing the anti-human CD70-specific hybridoma, Pr. T. Boon for the human melanoma cell lines, Dr. B. Richardson for the CD70 Luc reporter promoter, and Dr. A. Olichon and Cathy Bouchenot for the RhoA-coding adenovirus.

This work was supported by the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" and by grants from "La Ligue contre le Cancer", "Association pour la Recherche contre le Cancer", "le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" and from the "Institut Claudius Regaud".

The authors have no conflicting financial interests



## References

1. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M (2014) Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer* 14: 455-467.
2. Mehnert JM, Kluger HM (2012) Driver mutations in melanoma: lessons learned from bench-to-bedside studies. *Curr Oncol Rep* 14: 449-457.
3. Saldanha G, Potter L, Daforno P, Pringle JH (2006) Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies. *Clin Cancer Res* 12: 4499-4505.
4. Ades F, Metzger-Filho O (2012) Targeting the Cellular Signaling: BRAF Inhibition and Beyond for the Treatment of Metastatic Malignant Melanoma. *Dermatol Res Pract* 2012: 259170.
5. Flaherty L, Hamid O, Linette G, Schuchter L, Hallmeyer S, et al. (2014) A single-arm, open-label, expanded access study of vemurafenib in patients with metastatic melanoma in the United States. *Cancer J* 20: 18-24.
6. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, et al. (2013) BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 19: 1225-1231.
7. Sapkota B, Hill CE, Pollack BP (2013) Vemurafenib enhances MHC induction in BRAF homozygous melanoma cells. *Oncoimmunology* 2: e22890.
8. Jang S, Atkins MB (2014) Treatment of BRAF-mutant melanoma: the role of vemurafenib and other therapies. *Clin Pharmacol Ther* 95: 24-31.
9. Nolte MA, van Olfen RW, van Gisbergen KP, van Lier RA (2009) Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunol Rev* 229: 216-231.
10. Denoed J, Moser M (2011) Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *J Leukoc Biol* 89: 195-203.
11. Garcia P, De Heredia AB, Bellon T, Carpio E, Llano M, et al. (2004) Signalling via CD70, a member of the TNF family, regulates T cell functions. *J Leukoc Biol* 76: 263-270.
12. Cormary C, Hiver E, Mariame B, Favre G, Tilkin-Mariame AF (2005) Coexpression of CD40L and CD70 by semiallogenic tumor cells induces anti-tumor immunity. *Cancer Gene Ther* 12: 963-972.
13. Chahlavi A, Rayman P, Richmond AL, Biswas K, Zhang R, et al. (2005) Glioblastomas induce T-lymphocyte death by two distinct pathways involving gangliosides and CD70. *Cancer Res* 65: 5428-5438.
14. Jilaveanu LB, Sznol J, Aziz SA, Duchon D, Kluger HM, et al. (2012) CD70 expression patterns in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 43: 1394-1399.
15. Tilkin-Mariame AF, Cormary C, Ferro N, Sarrabayrouse G, Lajoie-Mazenc I, et al. (2005) Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. *FASEB J* 19: 1513-1515.
16. Sarrabayrouse G, Synaeve C, Leveque K, Favre G, Tilkin-Mariame AF (2007) Statins stimulate in vitro membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells. *Neoplasia* 9: 1078-1090.
17. Sarrabayrouse G, Pich C, Moriez R, Armand-Labit V, Rochaix P, et al. (2010) Melanoma cells treated with GGTI and IFN-gamma allow murine vaccination and enhance cytotoxic response against human melanoma cells. *PLoS One* 5: e9043.
18. Ridley AJ (2012) Historical overview of Rho GTPases. *Methods Mol Biol* 827: 3-12.
19. Vega FM, Ridley AJ (2008) Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 582: 2093-2101.
20. Lu Q, Wu A, Richardson BC (2005) Demethylation of the same promoter sequence increases CD70 expression in lupus T cells and T cells treated with lupus-inducing drugs. *J Immunol* 174: 6212-6219.
21. Pereira AM, Tudor C, Pouille PA, Shekhar S, Kanger JS, et al. (2014) Plasticity of the MAPK signaling network in response to mechanical stress. *PLoS One* 9: e101963.

22. Ruth MC, Xu Y, Maxwell IH, Ahn NG, Norris DA, et al. (2006) RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. *J Invest Dermatol* 126: 862-868.
23. Dua P, Gude RP (2008) Pentoxifylline impedes migration in B16F10 melanoma by modulating Rho GTPase activity and actin organisation. *Eur J Cancer* 44: 1587-1595.
24. Brown M, Roulson JA, Hart CA, Tawadros T, Clarke NW (2014) Arachidonic acid induction of Rho-mediated transendothelial migration in prostate cancer. *Br J Cancer* 110: 2099-2108.
25. Khatiwala CB, Kim PD, Peyton SR, Putnam AJ (2009) ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *J Bone Miner Res* 24: 886-898.
26. Makrodouli E, Oikonomou E, Koc M, Andera L, Sasazuki T, et al. (2011) BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Mol Cancer* 10: 118.
27. Gampel A, Mellor H (2002) Small interfering RNAs as a tool to assign Rho GTPase exchange-factor function in vivo. *Biochem J* 366: 393-398.
28. Chinestra P, Lajoie-Mazenc I, Faye JC, Favre G (2012) Use of phage display for the identification of molecular sensors specific for activated Rho. *Methods Mol Biol* 827: 283-303.

## Figures : titles and legends

### Figure 1. RhoA GTPase positively and transcriptionally controls CD70 membrane and global expression

LB1319-MEL cells were transfected with control siRNA (siCtrl), two RhoA-specific siRNAs (siRhoA1, siRhoA2), two RhoB-specific siRNAs (siRhoB1, siRhoB2), or two RhoC-specific siRNAs (siRhoC1, siRhoC2). 72 h post transfection, membrane associated CD70 levels were quantified using flow cytometry (A). Quantification of three different experiments is shown in (B). Western Blot analyses confirmed RhoA depletion and decreased in CD70 expression in LB1319-MEL cells 72h post siRNA transfection. Actin was used as a loading control (C). RhoA over-expression was induced in LB1319-MEL cells by infection with an AdenoRhoA (AdRhoA). 36h post infection, levels of membrane associated CD70 were detected by flow cytometry (D). Results of three different experiments are shown in (E). siRhoA2 transfection in LB1319-MEL cells decreases the accumulation of CD70 mRNA, as detected by RT-qPCR (F). Luciferase assay showed that downregulation of RhoA expression by siRhoA2 in LB1319-MEL cells represses CD70 promoter activity (G). Flow cytometry histograms are illustrated in Fold induction (FI) corresponding to the normalized level of membrane expressed CD70. Results are expressed as mean values  $\pm$  SD (error bars,  $n = 3$  experiments). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  versus control siRNA using the Tukey ANOVA test (B) or t-test (E, G, H).

### Figure 2. MEK kinase positively and transcriptionally controls CD70 membrane and global expression

LB1319-MEL and WM-266-4 cells were treated with 5  $\mu$ M of U0126 for 72h then analyzed by Western Blot for CD70, phospho-MEK and MEK expression. Actin was used as a loading control (A). LB39-MEL CD70+ cells were treated with 5  $\mu$ M of U0126 for 72h then fixed and processed for immunofluorescence directed against CD70. Pictures of U0126 treated cells and control (DMSO) conditions are presented (scale bar 50  $\mu$ m) (B). LB1319-MEL were treated or not with U0126 for 72h at indicated concentrations then analyzed by flow cytometry for membrane CD70 expression. Fold induction of CD70 membrane expression in triplicate condition is illustrated (C). Same experiments were performed in LB39-MEL CD70+ cells (D) and WM-226-4 cells (E). In LB1319-MEL cells treatment with 5  $\mu$ M of U0126 for 72h decreases the accumulation of CD70 mRNA, as detected by RT-qPCR (F). Results are expressed as mean values  $\pm$  SD (error bars,  $n = 3$  experiments). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  versus control siRNA using the Tukey ANOVA test (C, E) or t-test (D, F).

### Figure 3. Melanoma-expressed CD70 regulation by RhoA and the MAPK pathway

LB1319-MEL cells were transfected with control siRNA (siCtrl) and two RhoA-specific siRNAs (siRhoA1, siRhoA2). Western Blot analyses were performed 72 h after transfection for phospho- and total-ERK expression. Actin was used as a loading control (A). Quantification of three independent experiments is shown in (B). LB1319-MEL cells were treated with 5  $\mu$ M of U0126 for 72h then analyzed by the TRBD pull-down assay (Rho binding domain of Rhotekin) (C). Quantification of three independent experiments is shown in (D). LB1319-MEL cells were transfected with control siRNA (siCtrl) or siRhoA2 for 72 h. At the same time (24h after transfection), the same cells were treated or not with 5  $\mu$ M of U0126 for 48 h. Finally, cells were analyzed by flow cytometry for CD70 membrane expression. Quantification of three independent experiments by ISF is shown in (E). Results are expressed as mean values  $\pm$  SD (error bars,  $n = 3$  experiments). \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  versus control (siCtrl or DMSO) using the Tukey ANOVA test (B, E) or t-test (D).

**Figure 4. PLX-4032 inhibition and siBRAF decreases melanoma global and membrane-expressed CD70**

LB39-MEL CD70+ cells were treated with control medium (DMSO) or with PLX-4032 at indicated concentrations for 72 h then analyzed by flow cytometry for CD70 membrane expression (A) or by Western Blot for global CD70 expression. Actin was used as a loading control (B). Same experiments were performed in WM-266-4 cells (C, D) and LB1319-MEL cells (E, F). LB1319-MEL cells were transfected with control siRNA (siCtrl) and BRAF-specific siRNA (siBRAF). Cells were analyzed after 72 h of transfection by Western Blot for global CD70, phospho-MEK and total MEK expression (G). Actin was used as a loading control. Cells were analyzed after 72 h of transfection by flow cytometry for membrane CD70 expression (H). Cytometry results are expressed as mean values  $\pm$  SD (error bars,  $n = 3$  experiments). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  versus control condition (DMSO or siCtrl) using the t-test (G) or Tukey ANOVA test (A, C, E). Western Blot illustrations are representative of three independent experiments.

**Figure 5. Inhibition of MAPK pathway and killing of melanoma cells by Vemurafenib is independent of CD70 expression**

LB1319-MEL and WM-266-4 cells were transfected with control siRNA (siNeg) or a CD70-specific siRNA (siCD70) for 72 h. At the same time, these cells were treated or not with 1  $\mu$ M of PLX-4032 (PLX) for 72 h. Then cells were analyzed by Western Blot for phospho- and total-ERK expression and phospho- and total-MEK expression. Actin was used as a loading control (A). Same experiments were performed in WM-266-4 cells (B). Western Blot illustrations are representative of three different experiments. LB1319-MEL (C) and WM-266-4 (D) melanoma cells were transfected with siNeg or siCD70. Then cells were plated at  $1 \times 10^4$  cells and treated with 1  $\mu$ M of PLX-4032. 72 h after treatment, cells were counted using Coulter Counter. Quantification of three independent experiments are shown.

## Supplemental data

### Figure 1S

RhoB (A) and RhoC (B) silencing were checked by Western Blot in LB1319-MEL cells transfected with siCtrl, siRhoB1, siRhoB2, siRhoC1 or siRhoC2 for 72h. LB1319-MEL cells were transfected with siCtrl, siRhoA1 and siRhoA2. 72 h post transfection global CD70 expression was analyzed by Western Blot and quantified in three independent experiments in (C). LB39-MEL CD70+ cells were transfected with control siRNA (siCtrl) and siRhoA2. 72 h post transfection membrane associated CD70 levels were quantified using flow cytometry. Quantification of three different experiments is shown in (D). WM-266-4 cells were also transfected with siCtrl, siRhoA1 and siRhoA2. 72 h post transfection membrane associated CD70 levels was quantified using flow cytometry. Quantification of three different experiments is shown in (E). In the same cells, global CD70 expression was also analyzed by Western Blot as illustrated in (F) and quantified in three independent experiments in (G).

Results are expressed as mean values  $\pm$  SD (error bars,  $n = 3$  experiments). \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 versus control condition (siCtrl) using the t-test (D) or the Tukey ANOVA test (C, E, G).

### Figure 2S

MAPK pathway activation was evaluated by Western Blot in LB1319-MEL, LB39-MEL CD70+ and WM-266-4 cells (A). WM-266-4 cells were treated with 5  $\mu$ M of U0126 for 48 h and analyzed for global CD70 expression by Western Blot. Quantification of three independent experiments is shown in (B). Results are expressed as mean values  $\pm$  SD (error bars,  $n = 3$  experiments). \*\*\*P < 0.001 versus control condition (DMSO) using the t-test (B).

### Figure 3S

Three melanoma cell lines were treated with control medium (DMSO) or different doses of PLX4032 for 72 h, and analyzed for global CD70 expression by Western Blot. Quantification of three independent experiments is shown in (A) for LB39-MEL CD70+ cells, in (B) for WM-266-4 cells and in (C) for LB1319-MEL cells. Results are expressed as mean values  $\pm$  SD (error bars,  $n = 3$  experiments). \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 versus control condition (DMSO) using the Tukey ANOVA test (A, B, C).

### Figure 4S

CD70 silencing were checked by Western-Blot in LB1319-MEL cells (A) and in WM-266-4 (B) transfected with control siRNA (siNeg) or CD70 specific siRNA (siCD70). 72 h post transfection CD70 global expression was analyzed by Western-Blot (A, B). LB1319-MEL cells were transfected with siNeg or siCD70 and their *in vitro* proliferation was compared (C). Same experiments were performed with WM-266-4 cells (D).

Figure 1

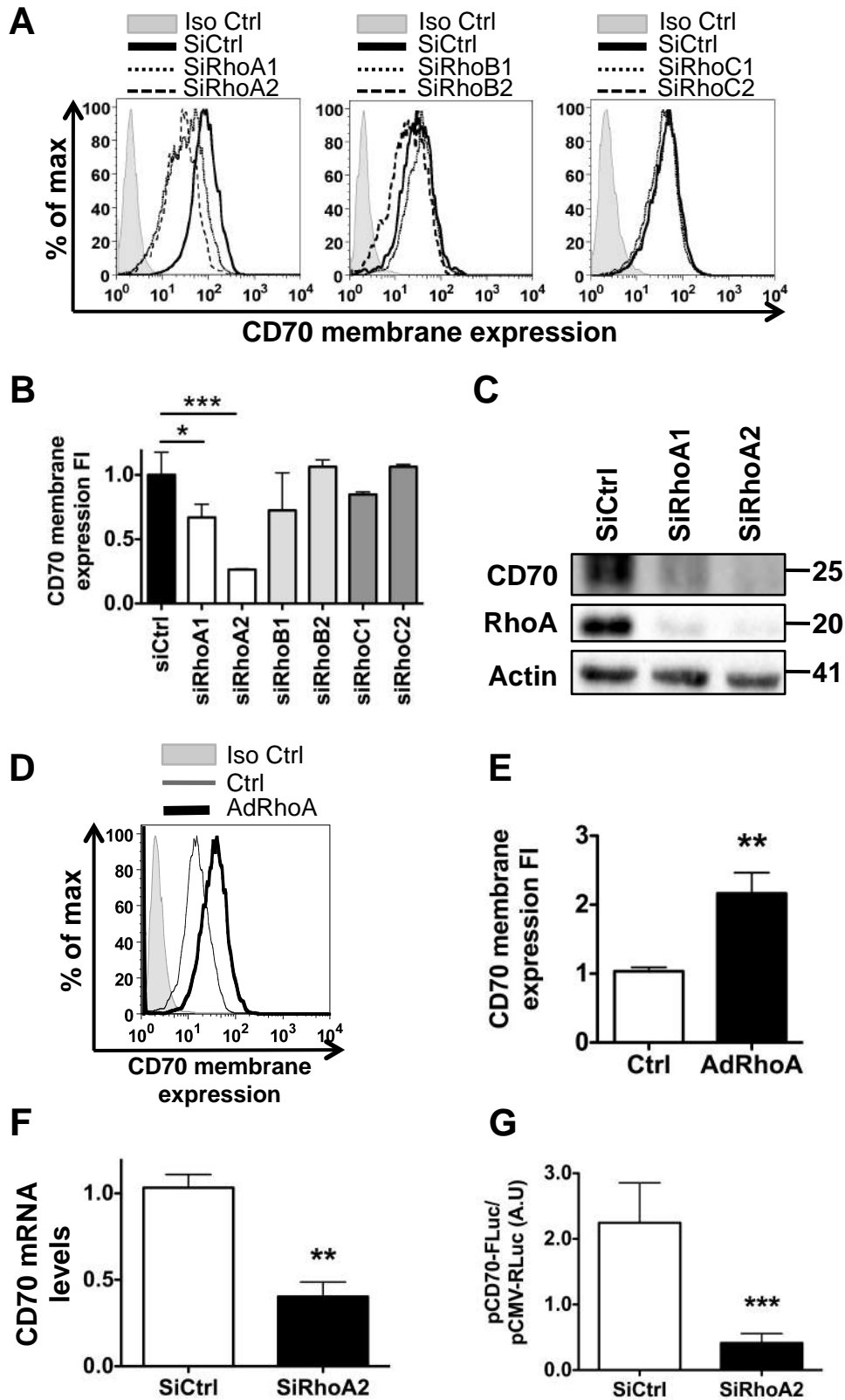


Figure 2

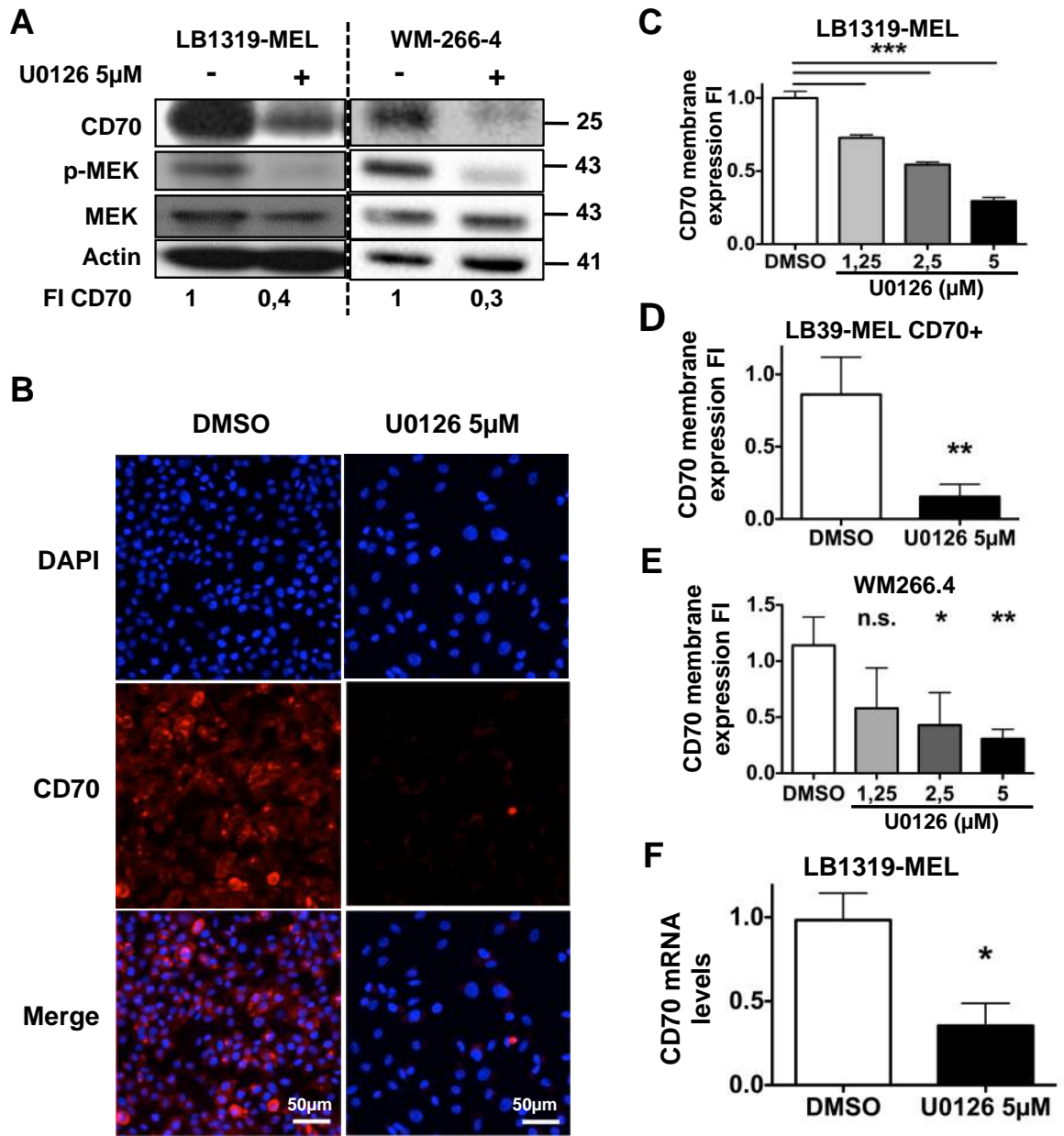


Figure 3

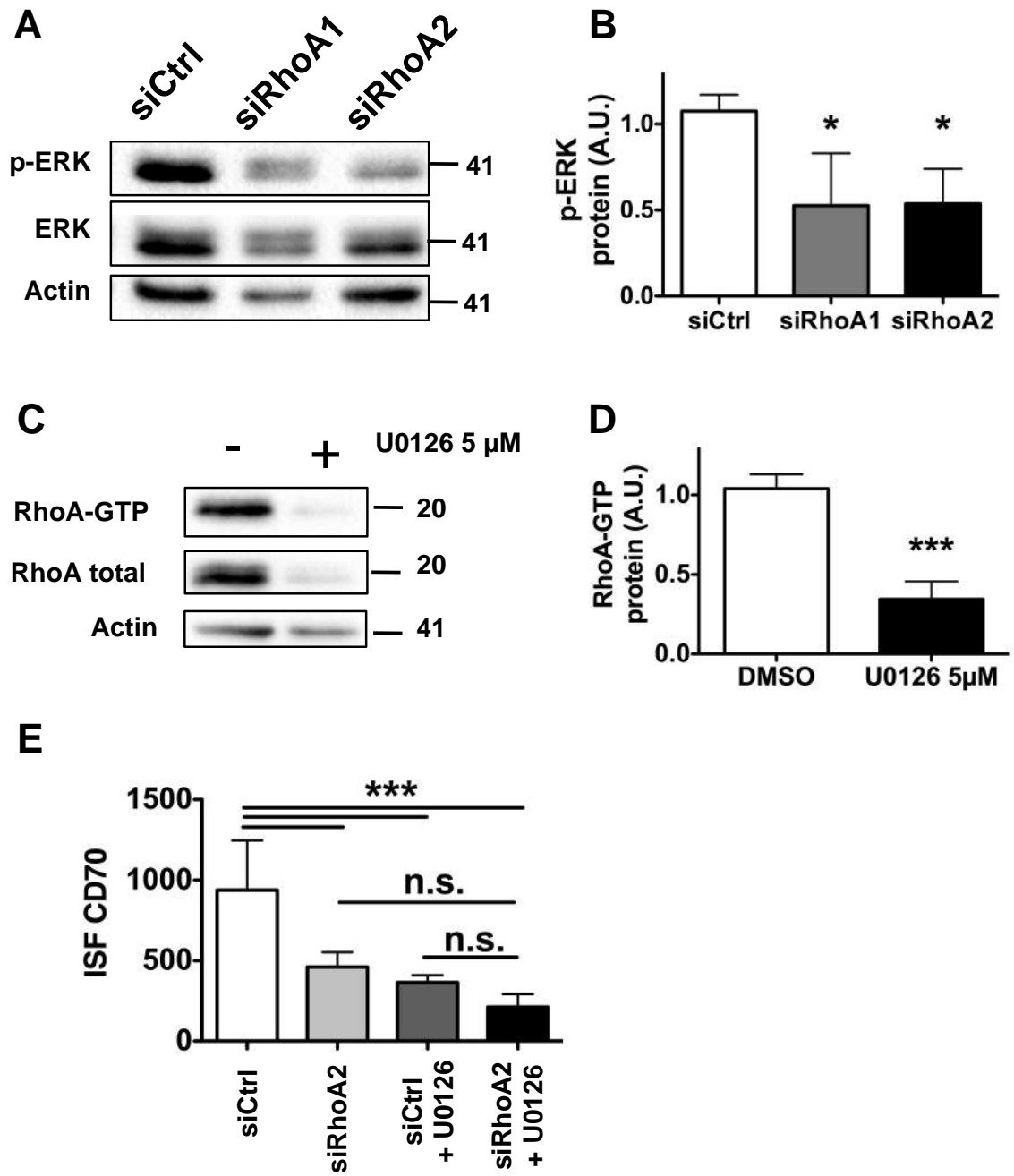




Figure 4

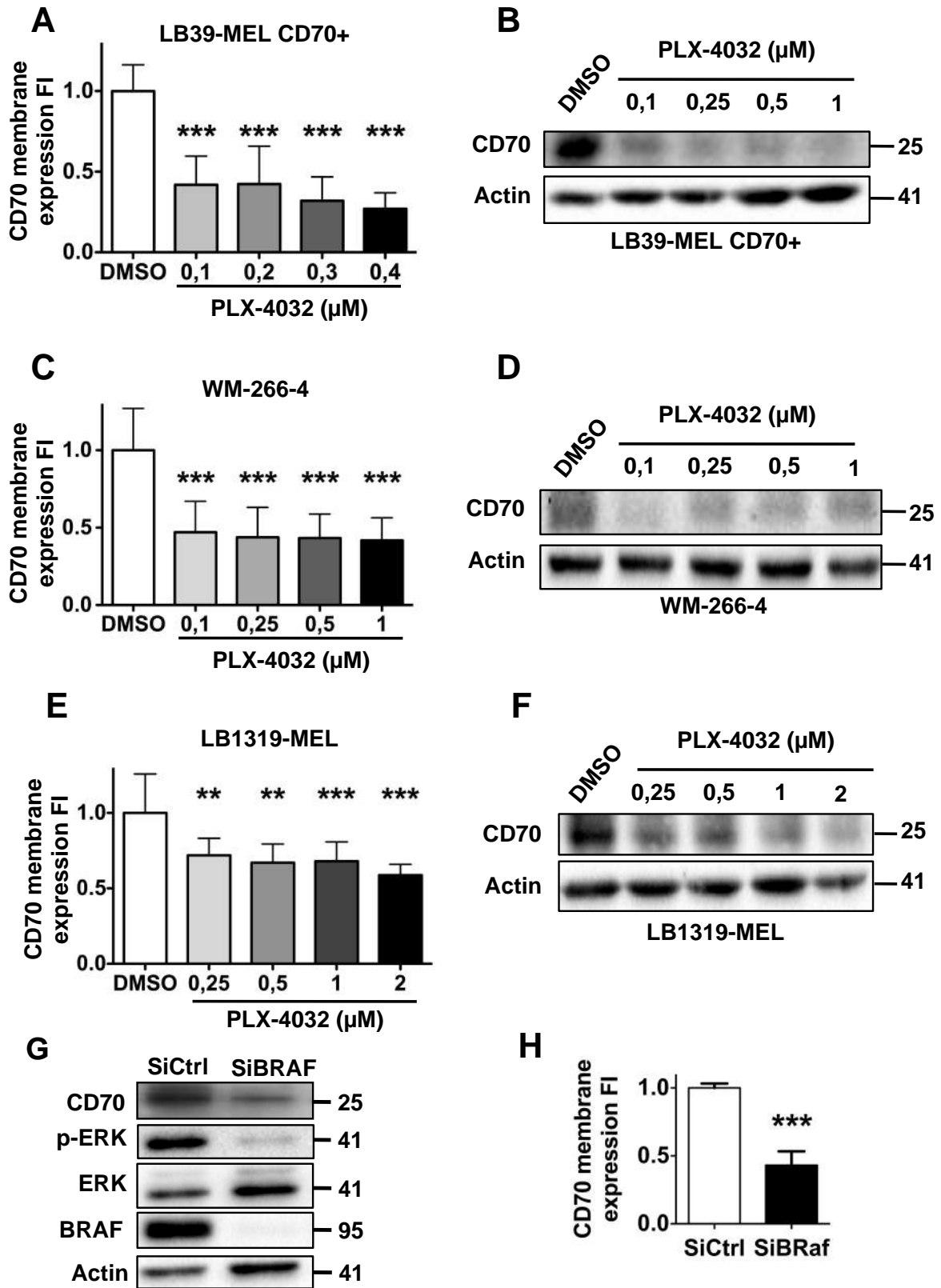
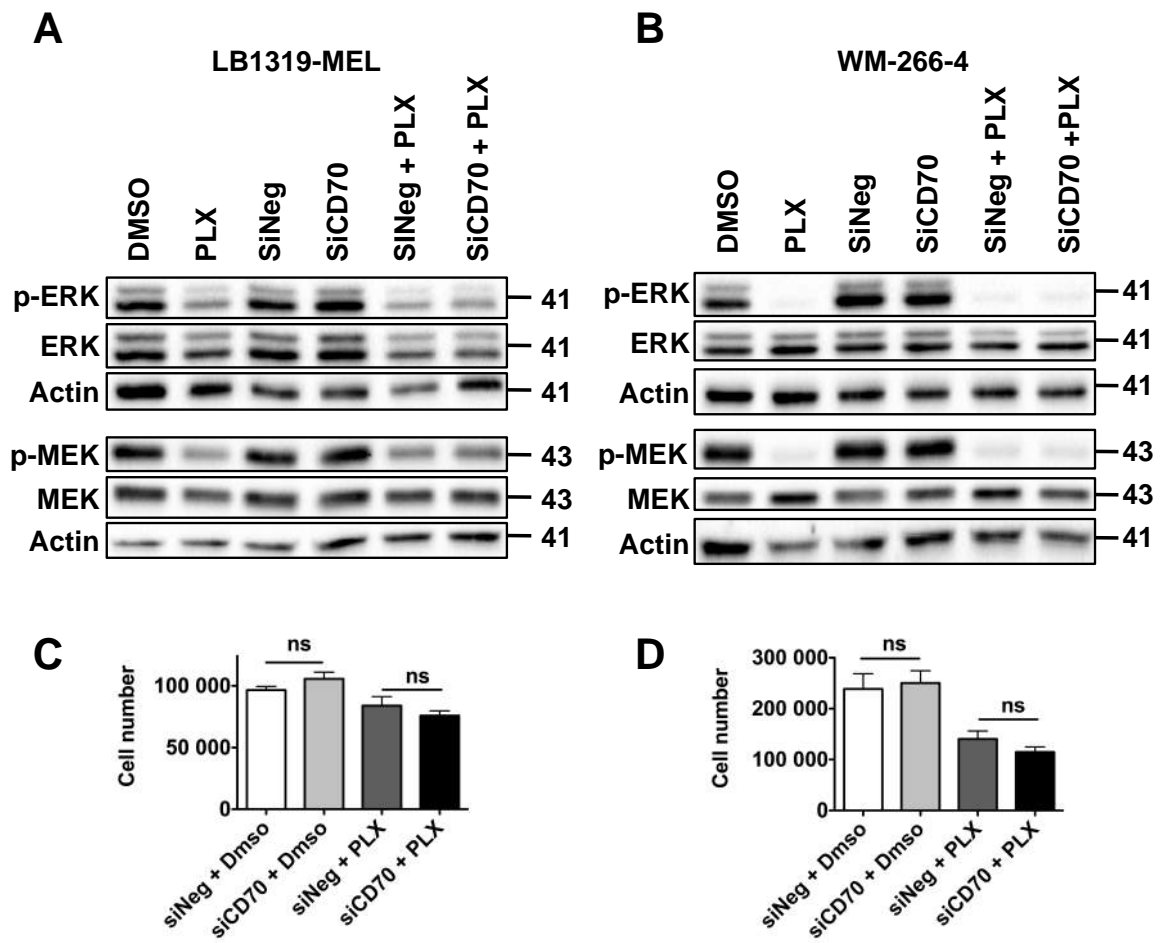
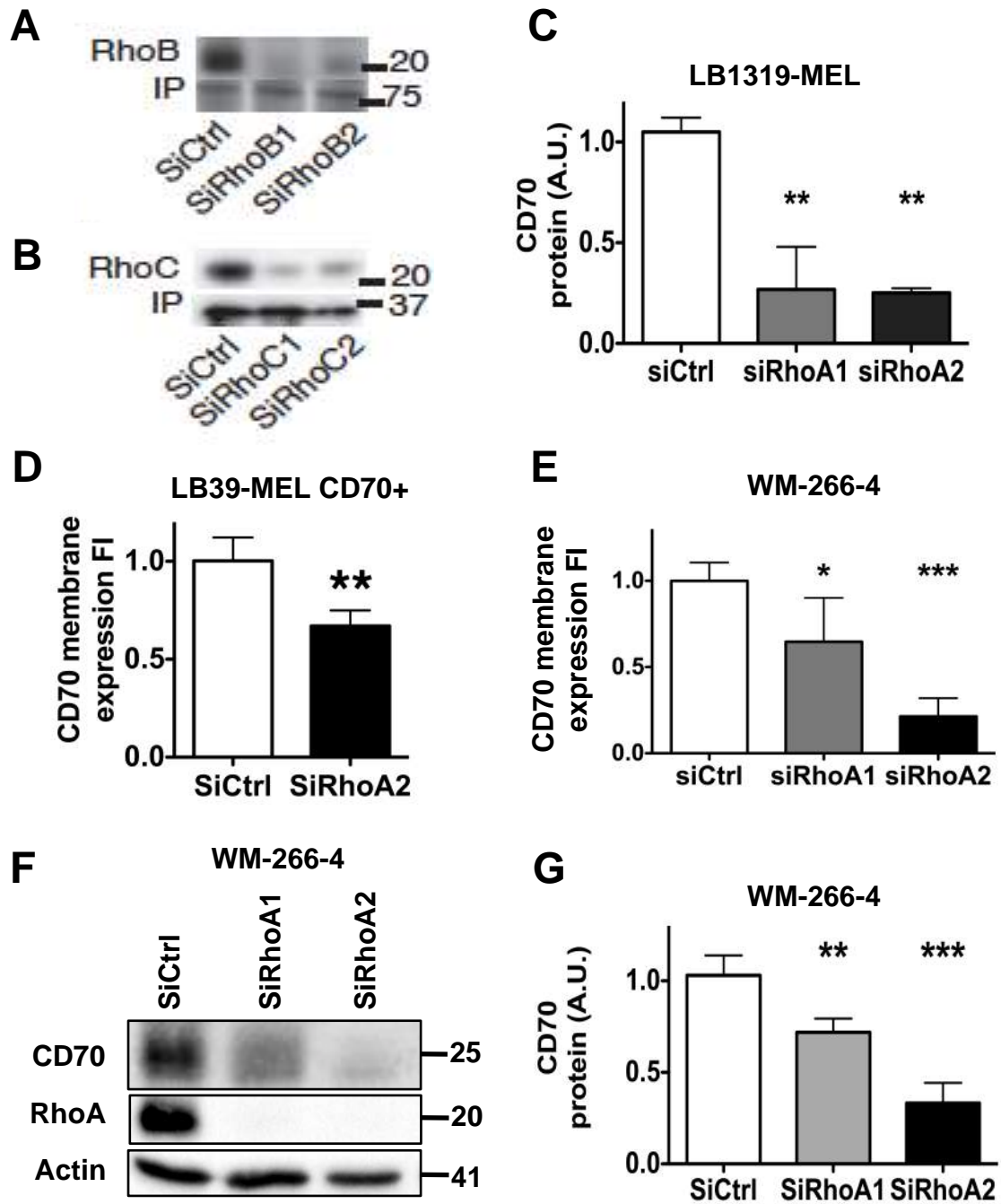


Figure 5

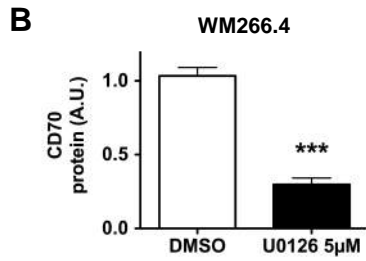
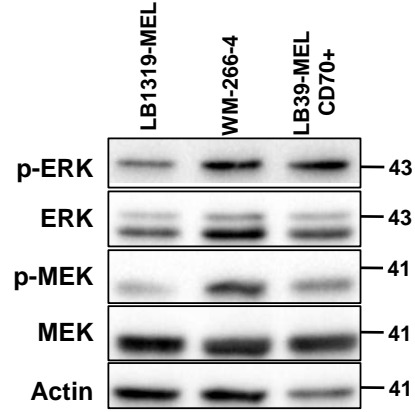


Supplemental Figure S1



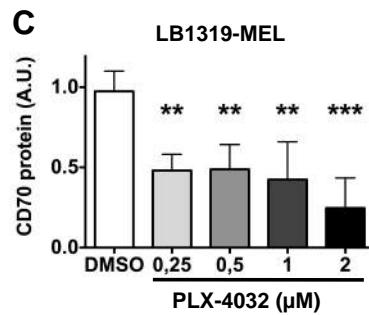
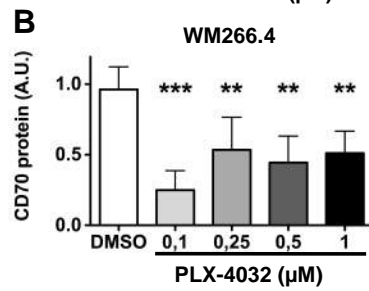
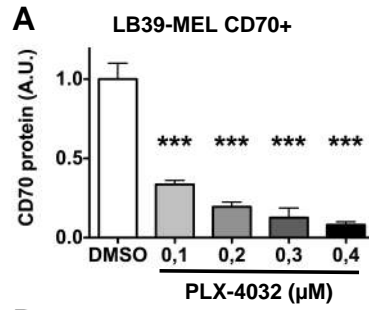
Supplemental Figure

S2



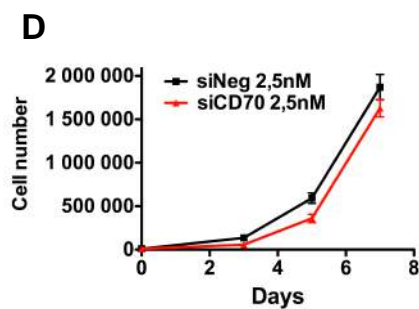
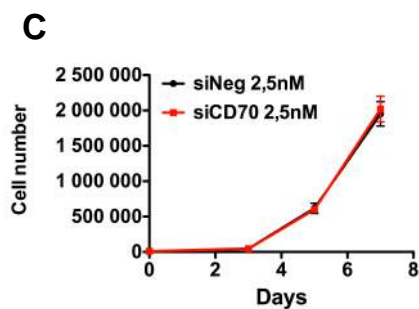
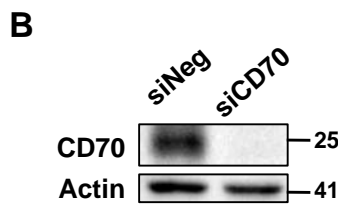
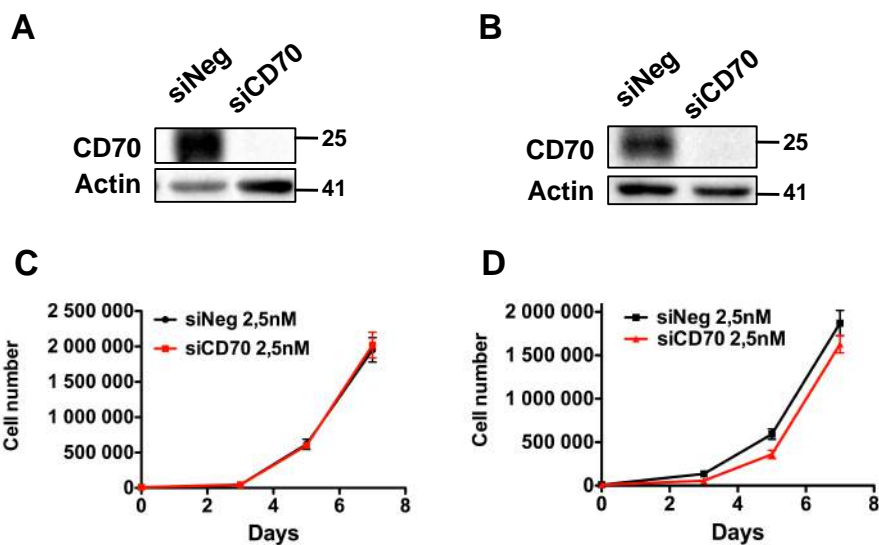
Supplemental Figure

S3



Supplemental Figure

S4



## Résultats V

### **ROCK inhibition-induced FasL overexpression decreases melanoma growth**

**Teiti Iotefa**, Pich Christine, Gence Rémi, Lajoie-Mazenc Isabelle, Rochaix Philippe, Favre Gilles and Tilkin-Mariamé Anne-Françoise.

**Article soumis à *Frontiers in Oncology*, en révision**

Le mélanome est un cancer dont l'incidence a triplé au cours des vingt dernières années (Belot et al, 2008). Si l'exérèse chirurgicale d'une tumeur de faible épaisseur est généralement curative, aucun traitement n'a encore fait la preuve de son efficacité sur les mélanomes plus avancés même si un nouvel inhibiteur de BRAF (le PLX4032) semble prometteur (Eggermont et al, 2013). L'inefficacité globale des traitements anti-cancéreux classiques dans le traitement du mélanome métastatique motive de nombreuses équipes dans l'exploration de nouvelles voies thérapeutiques telles que l'étude d'immunothérapies innovantes (Kim et al, 2014).

La surveillance immunologique repose sur la capacité du système immunitaire à reconnaître les cellules tumorales afin de limiter leur développement (Prendergast, 2013). Cependant, elle est souvent insuffisante pour engendrer une éradication tumorale à cause de mécanismes développés par les tumeurs pour combattre et paralyser le système immunitaire : il s'agit de l'échappement tumoral (Mittal et al, 2014). La protéine FasL est impliquée dans certains mécanismes d'échappement tumoral. FasL est physiologiquement exprimé à la surface des lymphocytes T et des cellules Natural Killer (NK) activés et est impliquée dans la cytotoxicité lymphocytaire, le privilège immunitaire et l'apoptose lymphocytaire associée à l'activation (Arakaki et al, 2014; Lettau et al, 2010). Son expression ectopique dans les tumeurs est décrite comme capable d'induire l'apoptose des lymphocytes T au contact des cellules tumorales et ainsi de contribuer à un échappement à la surveillance immunitaire (Ryan et al, 2006). Cependant, ce modèle de contre-attaque reste soumis à controverse en particulier suite à l'observation de réponses anti tumorales plus efficaces et de rejets de tumeurs amplifiés après transfection des cellules tumorales par FasL (Igney et al, 2005; Igney & Krammer, 2005; Wada et al, 2007).

Un travail récent de l'équipe a montré que la lignée de mélanome B16F10 exprime de façon constitutive un faible niveau de FasL et que la protéine RhoA et ses effecteurs ROCK régulent négativement l'expression membranaire de FasL (Sarrabayrouse et al, 2007). Le ligand FasL est fonctionnel sur les cellules B16F10 et est capable d'induire *in vitro* l'apoptose de lymphocytes Fas positifs. Suite à ces données, nous avons voulu étudier *in vivo* les rôles régulateurs de la voie RhoA/ROCK dans l'expression tumorale de FasL et ses conséquences sur le développement du mélanome B16F10.

Dans cette étude, nous avons montré que le traitement des cellules B16F10 par l'inhibiteur des protéines ROCK, H1152, induit une surexpression membranaire de FasL à une dose de 1  $\mu$ M. Ensuite, nous avons mis en évidence que ce traitement n'induit pas, par lui-même, dans nos conditions expérimentales, d'inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro*.

Nous avons voulu savoir si notre traitement par le H1152 induisait des modifications de la croissance tumorale *in vivo* suite à l'augmentation de l'expression membranaire de FasL. Pour cela, nous avons injecté à des souris syngéniques immunocompétentes C57BL/6 des cellules B16F10 prétraitées au H1152 et nous avons observé un ralentissement de la croissance tumorale et un retard dans l'apparition des tumeurs. L'utilisation de souris mutée pour le récepteur Fas (B6/*lpr*) a permis de vérifier que cette différence de développement tumoral implique la voie Fas/FasL et serait donc liée à la surexpression de FasL induite par le H1152. Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'implication des réponses immunes dans ce ralentissement tumoral. Le suivi de la croissance du mélanome B16F10 dans les mêmes conditions que précédemment mais dans des souris immunoincompétentes, NUDE ou KO pour l'IFN- $\gamma$ , a mis en évidence qu'une réponse lymphocytaire T cytotoxique impliquant l'IFN- $\gamma$  joue un rôle majoritaire dans ce ralentissement tumoral.

De plus, grâce à des expériences de déplétion *in vivo* des cellules CD8+ ou CD4+, à des analyses histologiques des tumeurs sous-cutanées et à l'analyse de l'infiltrat lymphocytaire, nous avons montré que l'effet bénéfique du prétraitement *in vitro* au H1152 sur la pousse tumorale est dépendant d'une infiltration de lymphocytes CD4 et surtout CD8 activés dans la tumeur.

Enfin, nos résultats montrent que l'implantation des métastases pulmonaires est réduite après inhibition des ROCK par le H1152, mais que la réponse immune adaptative ne semble pas être impliqué dans cet effet.

Ces résultats montrent que le prétraitement des cellules de mélanome B16F10 par un inhibiteur des Rho Kinases (H1152), via l'augmentation de FasL, favorise la réponse immune anti mélanome. Cet inhibiteur pourrait devenir un agent pharmacologique intéressant pour l'immunothérapie du mélanome.

# **ROCK inhibition-induced FasL over-expression decreases melanoma growth**

Teiti Iotefa<sup>1,2,3</sup>, Pich Christine<sup>1,2,3</sup>, Gence Rémi<sup>1,2,3</sup>, Lajoie-Mazenc Isabelle<sup>1,2,3</sup>, Rochaix Philippe<sup>2,3</sup>, Favre Gilles<sup>1,2,3</sup> and Tilkin-Mariamé Anne-Françoise<sup>1,2,3</sup>.

1 Unité INSERM UMR 1037, CRCT, Toulouse, France

2 Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France.

3 Université Paul Sabatier, Toulouse, France

**Corresponding author:** Tilkin-Mariamé Anne-Françoise<sup>1,2,3</sup> INSERM U1037 - Université

Toulouse 3 - ERL5294 CNRS, 2 avenue Hubert Curien, 31200 TOULOUSE - FRANCE

E-mail: anne-francoise.tilkin@inserm.fr

**Running title:** ROCK inhibition-induced melanoma control

**Keywords :** ROCK, melanoma, H1152, FasL, immune response,  
The authors have no conflicting financial interests.

## Abstract

Ectopic Fas-ligand (FasL) expression in tumor cells is responsible either of a tumor escape mechanism, through tumor counterattack of Fas-positive infiltrating lymphocytes, or of tumor rejection linked to inflammatory and immune responses. Our team previously showed that RhoA GTPase and its effectors ROCK negatively control FasL membrane expression on murine melanoma B16F10 cells.

In this study, we showed that B16F10 treatment with the ROCK inhibitor, H1152, reduces melanoma development *in vivo* through FasL membrane over-expression. H1152 treatment did not induce *in vitro* tumor growth slowing down. But *in vivo* in C57BL/6 immunocompetent mice, this treatment induced tumor appearance delay and slowing. Using mice bearing a mutated Fas receptor (B6/*lpr*), we showed that the slowing tumor growth, observed in immunocompetent mice, is linked to the FasL over-expression induced by H1152 treatment. Tumor growth follow-up in immunoincompetent NUDE and IFN $\gamma$ -KO mice highlighted a main role of T lymphocytes and IFN $\gamma$  in H1152-induced tumor growth slowing. Histological analyses of subcutaneous tumors, obtained from untreated- versus H1152-treated B16F10 cells, showed that H1152 pretreatment induced a strong lymphocytes intra-tumoral infiltration. Cytofluorometric analyses showed that CD8 activated lymphocytes mainly infiltrate these tumors and were responsible for the tumor growth slowing. Finally, H1152-induced ROCK inhibition also reduced pulmonary metastases implantation, but this effect was not dependant on T cells-mediated immune response.

Altogether our data show that B16F10 melanoma cells pretreatment with a Rho kinase inhibitor (H1152), through increased FasL expression, promotes anti-tumor immune response. This inhibitor could become an interesting pharmacologic molecule for melanoma immunotherapy.

## Introduction

Fas (also known as CD95/Apo-1) is a transmembrane protein belonging to the TNF receptor superfamily. It transmits an apoptotic signaling in susceptible cells once triggered by its natural ligand FasL (CD95L/CD178) [1]. Fas receptor is ubiquitously expressed on normal cells whereas FasL is mainly expressed on activated NK and T cells [2]. Fas-mediated apoptosis is important for various biological processes, including immune homeostasis through activation-induced cell death in T lymphocytes or cell-mediated cytotoxicity against tumor cells or virus infection [3, 4]. FasL is also expressed in the eye and testis where its pro-apoptotic activity contributes to the immune privilege status of these tissues [5, 6].



Cancer progression is often associated with acquisition of immune resistance of tumor cells [7]. FasL expression by tumor cells is one of those mechanisms responsible of immunological escape. Indeed, this ectopic expression allows tumor cells to counterattack and induce apoptosis in Fas-expressing cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells, infiltrating the tumor microenvironment [8-11]. However, the biologic significance of the Fas – FasL implication in human tumors remains under debate [12]. In fact, some studies reported that FasL expression on tumors triggers a neutrophil-mediated inflammatory response and tumor rejection [13]. Plus, it has also been shown that FasL expression levels modulate its effects [14]. At high levels, FasL triggers tumor rejection by a potent neutrophil-mediated local inflammation response, which starts of a T-lymphocytes-dependent anti-tumor-specific memory. In contrast, at low levels, FasL enhances tumor growth by counterattacking anti-tumor effector lymphocytes.

In a precedent study, it has been shown that RhoA GTPase and its effectors ROCK down-regulate *in vitro* membrane FasL expression on B16F10 melanoma cells [15]. B16F10 cells, over-expressing membrane FasL after pharmacological inhibition of the RhoA/ROCK pathway, were able to induce *in vitro* the apoptosis of cocultivated Fas-sensitive lymphocytes.

Rho GTPases belong to the Ras superfamily of GTP binding proteins [16]. After activation, the RhoA GTPase interacts with intracellular target proteins or effectors to trigger a wide variety of cellular responses, including the reorganization of the actin cytoskeleton, cell cycle progression, cell death, adhesion, metastasis, and gene transcription. Ones of its main effectors are ROCK kinase (Rho-associated protein kinase) [17]. These proteins are well described for modulating actin cytoskeleton and actin-myosin contractility through the phosphorylation of MYPT1 protein [18].

Many pharmacological molecules have been developed to target the RhoA/ROCK pathway. Statins inhibit the mevalonate pathway necessary for the prenylation and the activation of GTPases. Some of them are widely prescribed as hypocholesterolemic agents and they are now studied as potential anti-cancer agents [19]. Targeting ROCK proteins has been shown useful in cardiovascular diseases like the inhibitor Fasudil, which is indicated for cerebral vasospasm [20]. Due to their implication in migration and invasion capacities, they are now evaluated as anti-tumor therapies [21, 22].

In the present study, we have investigated the capacity of a ROCK inhibitor, the H1152, to modulate FasL membrane expression on B16F10 melanoma cell line and to control tumor growth. Thus, we have demonstrated that ROCK inhibition with H1152 induces *in vitro* FasL over-expression on melanoma membrane and *in vivo* tumor growth slowing-down, which is mediated by immune effector cells drawn in the tumor microenvironment.

## Materials and methods

***Tumor cell lines and animals***

The murine melanoma cell line B16F10 and hybridomas against murine CD4 and murine CD8 were obtained from ATCC and were *in vitro* maintained by serial passages in RPMI 1640 medium (*Lonza*) supplemented with 10% FCS, 1 mM glutamine, and 1% penicillin-streptomycin-amphotericinB (*Lonza*). Cultures were tested monthly to ensure that they were mycoplasma-free. Six- to nine-week-old female C57BL/6 wt and NMRI nude mice were obtained from *Elevages Janvier*. C57BL/6 IFN- $\gamma$ -KO mice were kindly provided by Pr. Jean-Charles Guéry (INSERM U1043, Toulouse) and B6/*lpr* mice were kindly provided by Pr. Pierre Bobé (CNRS UMR7592, Paris). The experiments in mice have been done in the appropriate conditions of husbandry, experimentation and care, controlled by the Ethic Comity of the Institut Claudius Regaud under the control of the Regional Comity of Midi-Pyrénées (France). Our protocols were validated and received the agreement number ICR-2009-0011.

***Treatment of melanoma cells***

Melanoma cells were treated *in vitro* with a ROCK inhibitor: H1152 (*Calbiochem*) at 1  $\mu$ M for 24 h.

***Flow cytometry analyses***

FITC-conjugated anti-Thy1.1, PE-conjugated anti-FasL, PE-conjugated anti-CD69, PE-conjugated anti-CD4 and APC-conjugated anti-CD8 mAbs, corresponding isotype controls and 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) were purchased from *BD Biosciences*. After 30 min incubation, the stained cells were analyzed on a BD FACS Calibur (*Becton Dickinson*) and results were analyzed with FlowJo software. Results are illustrated as % of positive cells for each molecule.

***In vitro proliferation***

$1 \times 10^5$  B16F10 cells, either untreated or pretreated for 24 h with 1  $\mu$ M of H1152, were cultivated *in vitro*. B16F10 cells were counted after 2, 4, 6 and 8 days of culture with Cell Counter (*Coulter*) to evaluate their *in vitro* proliferation, which allows evaluating the toxicity of the H1152 treatment.

***Subcutaneous tumor growth***

To study the tumor growth, all mice were injected subcutaneously with  $3 \times 10^5$  B16F10 cells either untreated or pretreated with 1  $\mu$ M of H1152 for 24 h. Melanoma cells were washed twice in PBS before injection. Animals were monitored for tumor growth every 2–3 days by palpation and diameters of the tumors were measured using a Vernier caliper. Tumor-bearing animals were sacrificed at day 14 after tumor injection. Results are expressed as mean surface  $\pm$ SD (error bars,  $n = 12$  to 16 mice).

### ***CD4 and CD8 cells depletion in C57BL/6 wt mice***

Neutralizing antibodies against murine CD4 and CD8 are produced from hybridomas TIB-207 and TIB-105 respectively. Antibodies were isolated and purified in our laboratory by affinity chromatography with ÄKTA Purifier system (*GE Healthcare Life Sciences*).

To validate their *in vivo* efficiency, these antibodies were injected intraperitoneally in C57BL/6 wt mice daily for 3 consecutive days at 200 µg for each mouse. On day 4, lymph nodes and spleen of each mouse were recovered and crashed in a manual manner through a Cell Strainer (*Falcon*). Then, extracted cells were analyzed for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> population by flow cytometry.

For tumor growth experiments, anti-CD4 and anti-CD8 neutralizing antibodies were injected intraperitoneally in C57BL/6 wt mice at day 0, 1, 2, 4, 7 and 11 after tumor inoculation at 200 µg for each mouse.

### ***Tumor infiltrating lymphocytes analyzes***

1x10<sup>6</sup> B16F10 cells, untreated or pretreated 24 h with 1 µM H1152, were injected subcutaneously in the flanks of C57BL/6 wt mice. Four days later, tumor masses were recovered and dissociated with the GentleMACS Dissociator (*Miltenyi*) according to manufacturer's instructions. Quantification of lymphocytes was performed thanks to the staining of extracted cells with anti-CD8, anti-CD3 and anti-CD69 antibodies and also a cell viability marker 7-AAD and then analyzed by flow cytometry.

### ***Cell migration in vitro assays***

Migration and invasion studies were performed using triplicate or quadruplicate wells. Migration assays were performed with 8-µm pore size transwell system (*BD Biosciences*).

B16F10 cells were untreated or pretreated 24 h with 1 µM H1152. Then, 2.5x10<sup>4</sup>/well melanoma cells were added in RPMI 1640 + 2% FCS in the upper compartment of the filter. The bottom chamber was filled with RPMI 1640 + 10% FCS. After 24 h, cells on the bottom surface of the filter were stained and counted. Photos were taken with an Eclipse Ti microscope (*Nikon Instruments*) and a CoolSNAP HQ2 camera (*Photometrics*) in three randomized fields.

### ***Histology***

Mice tissues were taken from the area surrounding the B16F10 cells inoculation sites and fixed in formol. Tissues were then embedded in paraffin wax and 5-µm serial sections were taken. Sections were then stained with haematoxylin & eosin (H&E) to estimate the tumor mass and infiltrate.

### ***Pulmonary metastases implantation***

To study pulmonary metastases implantation, C57BL/6 WT mice were injected intravenously (i.v.) with 2x10<sup>5</sup> B16F10 cells either untreated or pretreated 24 h with 1 µM H1152. The melanoma cells were washed twice in PBS before injection. Mice were sacrificed twelve days later. Macroscopic

metastases were detected visually and double blind quantified. Then, lungs were fixed in formalin and paraffin embedded to visualize microscopic metastases. Photos were taken with a DMR microscope (*Leica Microsystems*) and a DS-Fi1 camera (*Nikon Instruments*). Results are expressed as mean  $\pm$ SD (error bars,  $n = 12$  mice). The experiments included 4 mice/group and were repeated twice.

### ***Statistical analysis***

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Significance of analyses was assessed by t-test or Tukey one-way or two-way ANOVA test. All statistic tests were two-sides. The values are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) in the figures. P-values less than .05 were considered statistically significant.

## **Results**

### ***H1152 in vitro treatment of B16F10 melanoma cells induces FasL membrane over-expression without interfering their proliferation in vitro***

In our previous study, it has already been shown that inhibition RhoA pathway induced over-expression of membrane FasL on B16F10 melanoma cell line [15]. We confirm here that the inhibition of RhoA's effectors, ROCK kinases, with a pharmacological molecule, H1152 at 1  $\mu$ M for 24h also over-expressed membrane FasL on B16F10 cells (Figure 1A). Then we controlled that this H1152 treatment is not toxic for the B16F10 cells. B16F10 cells were untreated or treated for 24h with 1  $\mu$ M of H1152 then the cells were cultivated *in vitro* and counted every two days. This treatment with H1152 is not toxic by itself as B16F10 cells proliferate *in vitro* at similar rate after it (Figure 1B). These data confirm that membrane FasL over-expression does not interfere with B16F10 cells *in vitro* proliferation.

### ***H1152 pretreatment reduces in vivo local B16F10 melanoma growth through a Fas/FasL pathway dependent manner***

Based on previous studies reporting an ambiguous role of FasL in tumor development [13, 23], we wondered if H1152-induced FasL membrane over-expression could modulate *in vivo* tumor growth. We performed subcutaneous injections of  $3 \times 10^5$  B16F10 cells, either untreated or pretreated with 1  $\mu$ M of H1152 for 24h, into the flank of C57BL/6 wild-type mice. The resulting tumors showed that B16F10 cells pretreated with H1152 grew significantly slower than untreated cells (Figure 2A). Plus, the tumor appearance in mice is delayed of five days (Figure 2B). Then we wondered if the B16F10 melanoma shrinkage observed in immunocompetent mice was dependent of the FasL over-expression

or not. For that purpose, we used C57BL/6 mice naturally carrying the mutation *lpr* leading to a truncated and inactive form of the Fas receptor (B6/*lpr* mice) [24]. In these mice, we performed the same subcutaneous injections of  $3 \times 10^5$  B16F10 cells, either untreated or pretreated with 1 H1152 for 24h. Unlike in immunocompetent mice, we did not observe either tumor growth slowing down (Figure 2C) or tumor appearance delay (Figure 2D). These results confirm the essential role of membrane FasL over-expression on B16F10 cells in the reduction of tumor growth observed *in vivo* after H1152 pretreatment.

***Melanoma shrinkage after H1152 pretreatment is dependant of IFN- $\gamma$ -mediated T cell immune response***

We went further with regard to the immune mechanisms implicated in the FasL-mediated B16F10 melanoma shrinkage *in vivo*. For that,  $3 \times 10^5$  B16F10 cells, pretreated or not with H1152 at  $1 \mu\text{M}$  for 24h, were subcutaneously injected into the flank of IFN- $\gamma$ -KO C57BL/6 mice and NMRI nu/nu mice. The monitoring of tumor growth did not reveal any slow down neither in NMRI nu/nu mice (Figure 3A) nor in IFN- $\gamma$ -KO C57BL/6 mice (Figure 3C) when B16F10 cells were pretreated with H1152 compared to control. No tumor emergence delay was observed in the same mice (respectively Figure 3B and 3D). These results highlight a strong implication of adaptive immune response in shrinkage of H1152-induced FasL over-expressing B16F10 tumor growth through an IFN- $\gamma$  dependent mechanism.

***Pretreatment with H1152 induces a massive infiltration of immune cells in tumor site including activated TCD8+ cells***

We showed that the immunological status of mice was essential to observe the biological effect of ROCK inhibition-induced FasL over-expression on B16F10 tumor growth. Histological and flow cytometric analyses were performed to visualize the modifications of immune microenvironment in our model. First, double blind analyses of tumoral and surrounding tissues stained by hematoxylin and eosin (H&E) were done. To obtain these tissues,  $1 \times 10^6$  B16F10 cells pretreated or not with  $1 \mu\text{M}$  of H1152 for 24h were injected subcutaneously in C57BL/6 mice. Four days after tumor inoculation, tumors are recovered and embedded in paraffin. Examination of the H&E stained tumor sections revealed that H1152 pretreatment induce a massive infiltration of immune cells inside the tumor whereas with control cells this infiltration is weak and located at the tumor periphery (Figure 4A). Plus, in contrast to control cells, pretreated tumors showed a lower mitotic index, a lower cohesion and the presence of large cell death area (Figure 4A). We also analyzed by flow cytometry the infiltration of CD8+ lymphocytes cells in these tumors. Four days after tumor inoculation in the same conditions, tumors are recovered, dissociated with the GentleMACS dissociator, and then cells were analyzed by flow cytometry. Results showed a stronger infiltration of activated TCD8+ lymphocytes

(CD3+CD8+CD69+ cells) in pretreated tumors compared to control tumors (Figure 4B). We also checked that this tumoral infiltration was not due to a global higher amount of TCD8+ lymphocytes present in these mice as shown in Figure 4C.

***Depletion of CD8+ and CD4+ cells limits in vivo melanoma shrinkage occurring after H1152 pretreatment***

Control of immunogenic tumor cells occurs with the establishment of adaptative immune response mainly managed by TCD8+ and TCD4+ cells. We investigated the role of these immune populations in our model. We specifically depleted CD8+ or CD4+ cells in C57BL/6 mice by using neutralizing antibodies, TIB-105 and TIB-207 respectively, derived from hybridoma compared to a control antibody. These neutralizing antibodies were injected intraperitoneally in mice at 200 µg per injection at Day 0, 1, 2, 4, 7 and 11 after tumor inoculation. At Day 0,  $3 \times 10^5$  B16F10 cells, pretreated or not with 1 µM of H1152 for 24h, were subcutaneously injected in these mice, then tumor growth was monitored. *In vivo* efficiency of TIB-105 and TIB-207 neutralizing antibodies on depletion of CD8+ and CD4+ cell populations was assessed in our conditions four days after injection. The results confirmed that these antibodies were efficient for depleting there respective cell populations in spleen and lymph node (Figure S1A, S1B, S1C, S1D). As initially observed, H1152-pretreated B16F10 cells have a slower *in vivo* growth compared to control cells (Figure 5A). More interestingly, depletion of CD8+ population completely abolish this slowing down (Figure 5A) as the corresponding curve overlays the control curve. Concerning depletion of CD4+ cells, the effect on H1152-induced melanoma shrinkage is intermediate, as it does not completely restore the tumor growth as in the control condition (Figure 5B). So, these results show the strong implication of CD8+ cells lymphocytes in H1152-induced tumor growth control and a light effect of CD4+ cells.

***Pretreatment with H1152 inhibits in vitro migration and reduces pulmonary metastases implantation of B16F10 cells***

In melanoma pathology metastases is the most dangerous clinical step and therapies have limited efficiency at this stage. Moreover, ROCK kinases are well recognized as cell migration and cell invasion regulators, through modulation of actin cytoskeleton [18, 22]. So, we analyzed the impact of H1152 treatment on B16F10 cells motility and invasion. First, *in vitro* transwell assays showed that H1152 pretreatment in our conditions (1 µM for 24h) inhibits migration of B16F10 cells (Figure 6A). Then, B16F10 cells either untreated or pretreated with H1152 were injected intravenously into the tail vein of C57BL/6 wt mice and lungs were recovered 12 days later. Macro-quantification revealed a lower metastases number in the lungs of mice injected with H1152-pretreated B16F10 cells compared to control cells (Figure 6B), showing that H1152 pretreatment decreases metastatic implantation capacity of melanoma cells. Figure 6C illustrates lungs H&E staining of a representative experiment.

We wondered if this reduction of metastases implantation could be dependant of an adaptative immune response. So same experiments were performed in NMRI nu/nu mice. The number of lung metastases was decreased in NMRI nu/nu mice injected with H1152-pretreated B16F10 cells versus untreated cells. Moreover, the ratio between the numbers of metastases obtained with untreated versus H1152-pretreated B16F10 cells (3.7-fold) is similar in immunocompetent and immunocompromised mice, which strongly suggest that T lymphocytes are not involved in H1152-dependent metastases reduction. Therefore, we hypothesized that this decrease of metastatic potential was due to an intrinsic property of ROCK inhibition.

## Discussion

Melanomas are immunogenic tumors, which express tumor antigens and other molecules recognized by the effectors of innate and adaptive immune responses. This recognition could be avoided by many mechanisms leading to the immune escape of tumors. One of these mechanisms is the ectopic expression of FasL on tumor cells that triggers a counterattack against Fas expressing lymphocytes. However, the FasL-mediated tumor counterattack could be reversed as FasL over-expression on cancer cells can also elicit anti-tumor effects.

Our study was to find out if treatment with a ROCK inhibitor, such as H1152, could induce melanoma over-expression of FasL capable of promoting tumor rejection. In this case, such inhibitors might have an interest in the treatment of metastatic melanoma. Recently, a study reported that FasL ambivalent role in cancer could be related to its time of expression. In fact, they showed that when FasL is initially expressed on injected cancer cells, it can elicit anti-tumor activity. But when FasL expression is delayed after tumor implantation, the tumor microenvironment abrogates FasL-mediated anti-tumor activity [25]. Moreover a previous publication had shown that FasL ambivalent role in melanoma would rather be connected to its level of expression, high expression favoring tumor rejection while low expression inducing tumor escape through FasL counterattack [14].

Altogether our present *in vivo* experiments showed that H1152 *in vitro* treatment of B16F10 melanoma cells induces FasL membrane over-expression without interfering their proliferation *in vitro*, and this FasL over-expression triggers *in vivo* a protective immune tumor-microenvironment. Indeed, we showed that tumor development from H1152-treated-B16F10 cells were significantly reduced *in vivo*. This effect was dependent of Fas/FasL pathway and mainly mediated by immune response of IFN- $\gamma$ -T CD8<sup>+</sup> lymphocytes. Our results are consistent with studies reporting FasL over-expression as an inducer of anti-tumor immune responses [14, 25-27].

Tumor infiltrating CD8 lymphocytes play a major role in the reduction of FasL over-expressing B16F10 melanoma growth. Indeed, CD8 activated lymphocytes mainly infiltrate these tumors and were responsible for the tumor growth slowing down, as specific *in vivo* depletion of CD8<sup>+</sup> population

restores tumor growth of H1152-pretreated B16F10 cells even if FasL was over-expressed on these cells. On the other side, specific depletion of CD4<sup>+</sup> cells had an intermediate effect partially restoring tumor growth. This intermediate effect could be explained by the diversity and the opposite effects of CD4<sup>+</sup> T cell subsets present in tumor microenvironnement, including anti-tumoral Th1 cells and immunosuppressive T regulatory (Treg) cells [28]. It was previously shown with B16F10 cells transfected with FasL that Treg cells limit inflammatory response by inhibiting neutrophil accumulation and survival. Therefore, these Treg cells favor melanoma growth [29]. Here, we generated a FasL over-expression through ROCK inhibition, and our depletion experiments showed that the selective elimination of CD8<sup>+</sup> cells is sufficient to restore proper tumor growth.

We demonstrated that H1152-induced melanoma shrinkage was associated with a massive infiltration of activated CD8<sup>+</sup> lymphocytes. These results are consistent with Erdag et al. who demonstrated that higher densities of CD8<sup>+</sup> T cells are correlated to a better survival in melanoma patients [30]. Moreover, studies led by Pr. Galon's team correlated a good survival prognosis of colorectal cancer patients to the infiltration of T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> memory cells [31, 32]. Memory immunity has not been evaluated in our present study, but we can speculate that the H1152-induced increase of tumor infiltrating activated CD8<sup>+</sup> lymphocytes could then generate CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> memory cells.

Our last results showed that ROCK inhibition reduces cell migration and pulmonary metastases implantation. These results are mainly due to the intrinsic capacity of H1152 ROCK inhibitor to reduce ROCK kinases control of cell migration and cancer cells invasion [18]. This hypothesis is reinforced by our experiments done in immunodepressed NMRI nu/nu mice, which revealed that an adaptative immune response involving T lymphocytes was not responsible of the metastases reduction. Moreover, some studies reported that even if FasL is well established as an apoptosis inducer, it is now recognized as an inducer of cell invasion and cell migration [33]. However, it is well know that NK cells play an important role in the control of metastatic processes [34]. As the mutation present in NUDE mice does not impact NK cells generation and activity, an innate immunity-independent effect of ROCK inhibition on metastases development cannot be excluded yet.

These results show that the B16F10 melanoma cells pretreatment with a Rho kinase inhibitor (H1152), through increased FasL expression, promotes anti-tumor immune response. Therefore, this inhibitor could become an interesting pharmacologic molecule for melanoma immunotherapy.

## **Acknowledgements**

This work was supported by INSERM and by grants from Ligue Contre le Cancer, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and Institut Claudius Regaud. We thanks Pr. Jean-Charles Guéry and Pr. Pierre Bobé for providing IFN- $\gamma$ -KO C56BL/6 mice and B6/*lpr* mice respectively.



## References

- [1] Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95 *Mol Cell Biol* **22**, 207-220.
- [2] Lettau M, Paulsen M, Schmidt H, Janssen O (2010). Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology *Eur J Cell Biol* **90**, 456-466.
- [3] Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N (2014). Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression *Crit Rev Immunol* **34**, 301-314.
- [4] Peter ME, Krammer PH (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond *Cell Death Differ* **10**, 26-35.
- [5] Ferguson TA, Griffith TS (2006). A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later *Immunol Rev* **213**, 228-238.
- [6] Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege *Science* **270**, 1189-1192.
- [7] Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer *Annu Rev Immunol* **29**, 235-271.
- [8] O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F (1996). The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand *J Exp Med* **184**, 1075-1082.
- [9] Ryan AE, Shanahan F, O'Connell J, Houston AM (2006). Fas ligand promotes tumor immune evasion of colon cancer in vivo *Cell Cycle* **5**, 246-249.
- [10] Sejima T, Morizane S, Hinata N, Yao A, Isoyama T, Saito M, Takenaka A (2012). Fas expression in renal cell carcinoma accurately predicts patient survival after radical nephrectomy *Urol Int* **88**, 263-270.
- [11] Lin Y, Liu L, Zhang T, Liu J (2013). Functional investigation of Fas ligand expressions in human non-small cell lung cancer cells and its clinical implications *Ann Thorac Surg* **95**, 412-418.
- [12] Igney FH, Krammer PH (2005). Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother* **54**, 1127-1136.
- [13] Igney FH, Behrens CK, Krammer PH (2005). CD95L mediates tumor counterattack in vitro but induces neutrophil-independent tumor rejection in vivo *Int J Cancer* **113**, 78-87.
- [14] Wada A, Tada Y, Kawamura K, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Takenouchi T, J OW, Tagawa M (2007). The effects of FasL on inflammation and tumor survival are dependent on its expression levels *Cancer Gene Ther* **14**, 262-267.
- [15] Sarrabayrouse G, Synaeve C, Leveque K, Favre G, Tilkin-Mariame AF (2007). Statins stimulate in vitro membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells *Neoplasia* **9**, 1078-1090.
- [16] Vega FM, Ridley AJ (2008). Rho GTPases in cancer cell biology *FEBS Lett* **582**, 2093-2101.
- [17] Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice *FEBS Lett* **392**, 189-193.
- [18] Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion *Cancer Metastasis Rev* **28**, 65-76.

- [19] Boudreau DM, Yu O, Johnson J (2010). Statin use and cancer risk: a comprehensive review *Expert Opin Drug Saf* **9**, 603-621.
- [20] Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, Sugiyama H, Seto M, Takakura K (2008). Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil-ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post-marketing surveillance study *Neurol Med Chir (Tokyo)* **48**, 241-247; discussion 247-248.
- [21] Olson MF (2008). Applications for ROCK kinase inhibition *Curr Opin Cell Biol* **20**, 242-248.
- [22] Patel RA, Liu Y, Wang B, Li R, Sebti SM (2014). Identification of novel ROCK inhibitors with anti-migratory and anti-invasive activities *Oncogene* **33**, 550-555.
- [23] Tong Q, Liu K, Wang G (2006). FasL expression in colorectal carcinoma and its significance in immune escape of cancer *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **26**, 79-81.
- [24] Nagata S (1994). Mutations in the Fas antigen gene in lpr mice *Semin Immunol* **6**, 3-8.
- [25] Chiu HY, Sun GH, Chen SY, Wang HH, Ho MY, Chu CY, Wu WL, Jhou RS, Tsai YL, Huang RT, et al. (2013). Pre-existing Fas ligand (FasL) in cancer cells elicits tumor-specific protective immunity, but delayed induction of FasL expression after inoculation facilitates tumor formation *Mol Carcinog* **52**, 705-714.
- [26] Arai H, Gordon D, Nabel EG, Nabel GJ (1997). Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13862-13867.
- [27] Seino K, Kayagaki N, Okumura K, Yagita H (1997). Antitumor effect of locally produced CD95 ligand *Nat Med* **3**, 165-170.
- [28] Geginat J, Paroni M, Facciotti F, Gruarin P, Kastirr I, Caprioli F, Pagani M, Abrignani S (2013). The CD4-centered universe of human T cell subsets *Semin Immunol* **25**, 252-262.
- [29] Richards H, Williams A, Jones E, Hindley J, Godkin A, Simon AK, Gallimore A (2010). Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin *Immunology* **131**, 583-592.
- [30] Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, Slingluff CL, Jr. (2012). Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma *Cancer Res* **72**, 1070-1080.
- [31] Fridman WH, Galon J, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C, Kroemer G (2011). Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates *Cancer Res* **71**, 5601-5605.
- [32] Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, et al. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer *N Engl J Med* **353**, 2654-2666.
- [33] Lin HC, Lai PY, Lin YP, Huang JY, Yang BC (2012). Fas ligand enhances malignant behavior of tumor cells through interaction with Met, hepatocyte growth factor receptor, in lipid rafts *J Biol Chem* **287**, 20664-20673.
- [34] Mehlen P, Puisieux A (2006). Metastasis: a question of life or death *Nat Rev Cancer* **6**, 449-458.

**Figure 1. Inhibition of ROCK increases FasL membrane expression on B16F10 melanoma cells without cell toxicity.**

B16F10 cells were treated or not with 1  $\mu$ M of H1152 for 24 h then membrane FasL expression was quantified using flow cytometry (A). B16F10 cells were treated or not with 1  $\mu$ M of H1152 then these cells put in culture and every 2 days pretreated or untreated B16F10 cells were counted to evaluate the *in vitro* proliferation (B). Results are expressed as mean  $\pm$  SD (error bars, n = 3 experiments).

**Figure 2. Inhibition of ROCK reduces *in vivo* melanoma growth through Fas/FasL pathway.**

$3 \times 10^5$  B16F10 cells pretreated or not with 1  $\mu$ M H1152 for 24 h were injected subcutaneously in C57BL/6 immunocompetent mice (n=20 mice for each group). *In vivo* tumor growth was monitored regularly (A) and number of tumor-free mice was also assessed (B). Same experiments were performed in Fas-deficient C57BL/6 *lpr* mice (C, D) (n=16 mice for each group). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. \*\*\*P < 0.001 versus control using the Tukey ANOVA test.

**Figure 3. An IFN- $\gamma$  dependant lymphocytes response is involved in the *in vivo* melanoma shrinkage observed in C57BL/6 immunocompetent mice following ROCK inhibition.**

$3 \times 10^5$  B16F10 cells pretreated or not with 1  $\mu$ M of H1152 for 24 h were injected subcutaneously in nude NMRI mice (n=12 mice for each group). *In vivo* tumor growth was monitored regularly (A) and number of tumor-free mice was also assessed (B). Same experiments were performed in IFN- $\gamma$ -KO C57BL/6 mice (C, D) (n=16 mice for each group). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. ns versus control using the Tukey ANOVA test.

**Figure 4. H1152 pretreatment recruits a massive infiltration of immune cells into the tumor site.**

B16F10 cells pretreated or not with 1 $\mu$ M of H1152 for 24 h were injected subcutaneously in C57BL/6 mice. Four days later, mice were killed and tumors were collected for histology. Haematoxylin & eosin-stained 5- $\mu$ m paraffin-mounted sections were generated (A). Also, tumor masses were recovered and tumor infiltrating cells were extracted with the Gentle MACS Dissociator according manufacturer's instructions and TIL CD8+CD69+ were analyzed by flow cytometry (B). In the same mice, spleens were recovered, splenic cells were extracted by manual dissociation through a Cell Strainer and CD8+ cells were analyzed by flow cytometry (C). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05 versus control using the Student t-test (B, C).

**Figure 5. Infiltration of T CD8+ cells in tumors is mainly responsible for B16F10 tumor growth slowing-down and TCD4+ cells are lightly involved.**

B16F10 cells pretreated or not with 1  $\mu$ M of H1152 for 24 h were injected subcutaneously in C57BL/6 mice (13<n<22 mice for each group). Mice received five intraperitoneal injections of anti-CD8 (A) or

anti-CD4 (B) neutralizing antibody or control antibody at 200 µg between Day 0 and Day 11 after tumor injection. Then, *in vivo* tumor growth was monitored regularly until sacrifice at Day 14. Results are expressed as mean ± SEM. \*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001 versus control using the Tukey ANOVA test (A, B).

**Figure 6. ROCK inhibition with H1152 reduces *in vitro* cell migration and *in vivo* metastases' establishment in lung without implication of T lymphocytes**

*In vitro* migration of B16F10 cells untreated or pretreated with H1152 1 µM for 24 h was analyzed using transwell assays (A). B16F10 cells untreated or pretreated with H1152 1 µM for 24 h were injected intravenously in C57BL/6 mice. Twelve days after inoculation, lungs were recovered and macroscopic pulmonary metastases were quantified (B). Lung photomicrographs are shown for representative lungs of C57BL/6 mice (C). Results are expressed as mean ± SD. \*\*P < 0.005; \*\*\*P < 0.001 versus control using the Student t-test. B16F10 cells untreated or pretreated with H1152 1 µM for 24 h were injected intravenously in nude NMRI mice (D). Twelve days after inoculation, lungs were recovered and macroscopic pulmonary metastases were quantified. Results are expressed as mean ± SD. \*\*P < 0.005 versus control using the Student t-test.

**Figure S1. Neutralizing antibodies against CD8+ and CD4+ cells are functional in mice.**

C57BL/6 mice were injected with anti-CD8 or anti-CD4 neutralizing antibody or control antibody intraperitoneally at 200 µg each day for three consecutive days. The fourth day, spleens (A, C) and lymph nodes (B, D) were recovered, cells were extracted by manual dissociation through a Cell Strainer and CD8+ (A, B) and CD4+ (C, D) cells were analysed by flow cytometry. \*\*P < 0.005; \*\*\*P < 0.001 versus control using the Student t-test.

Figure 1

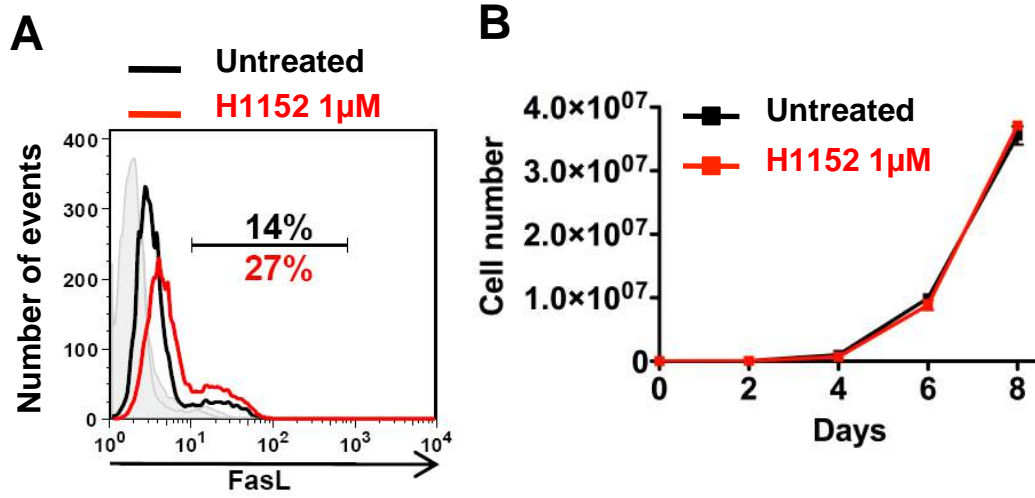


Figure 2

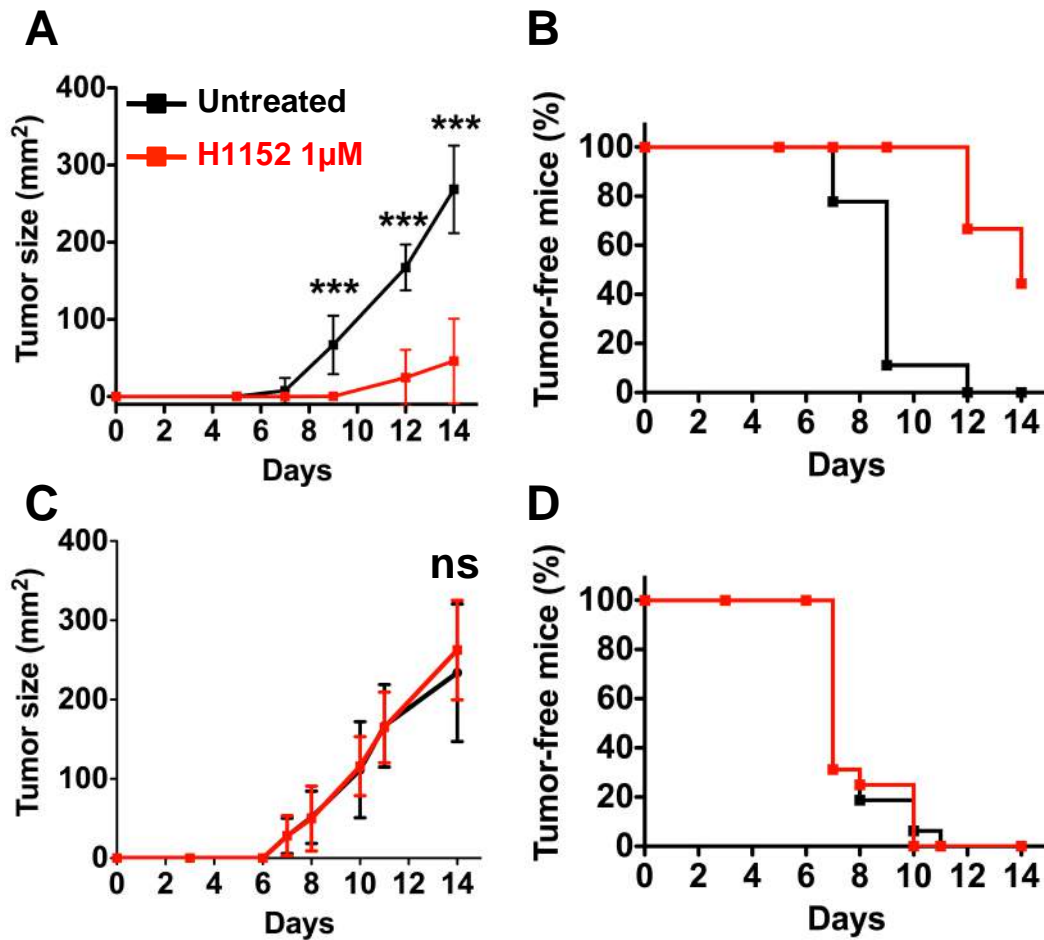
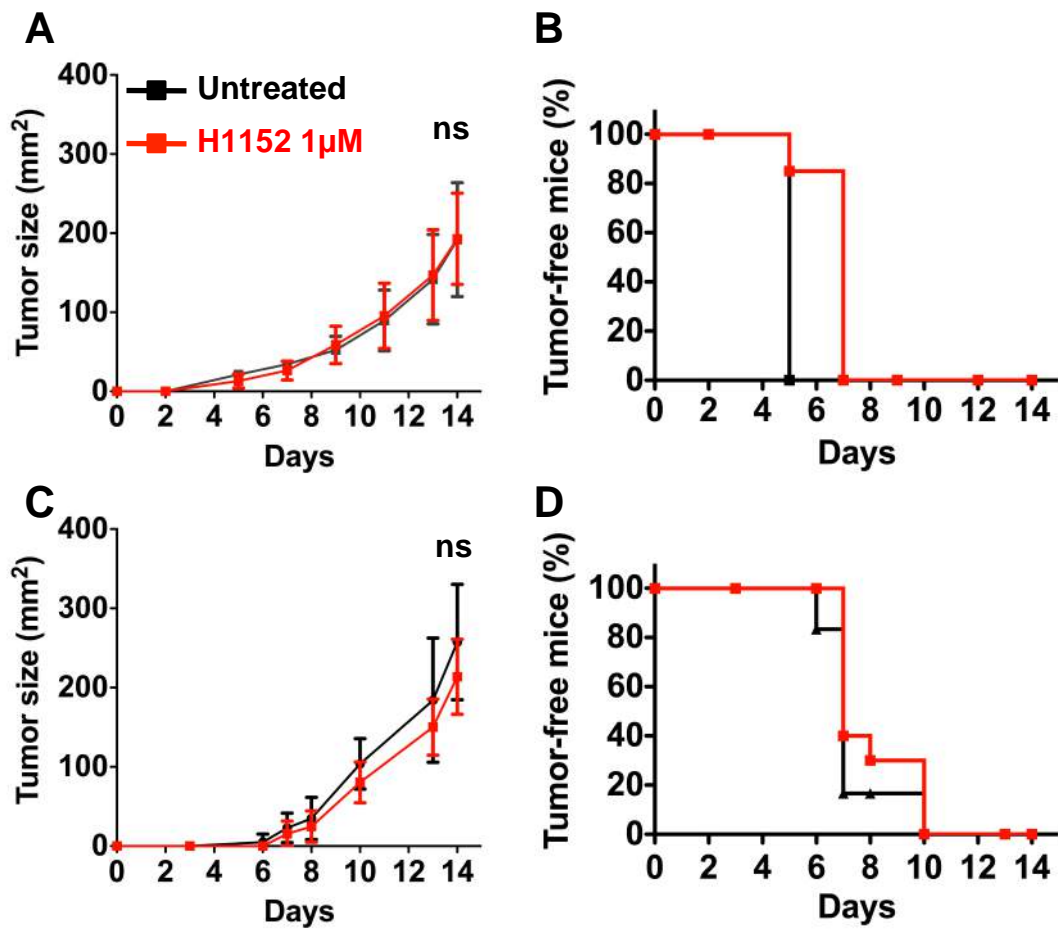
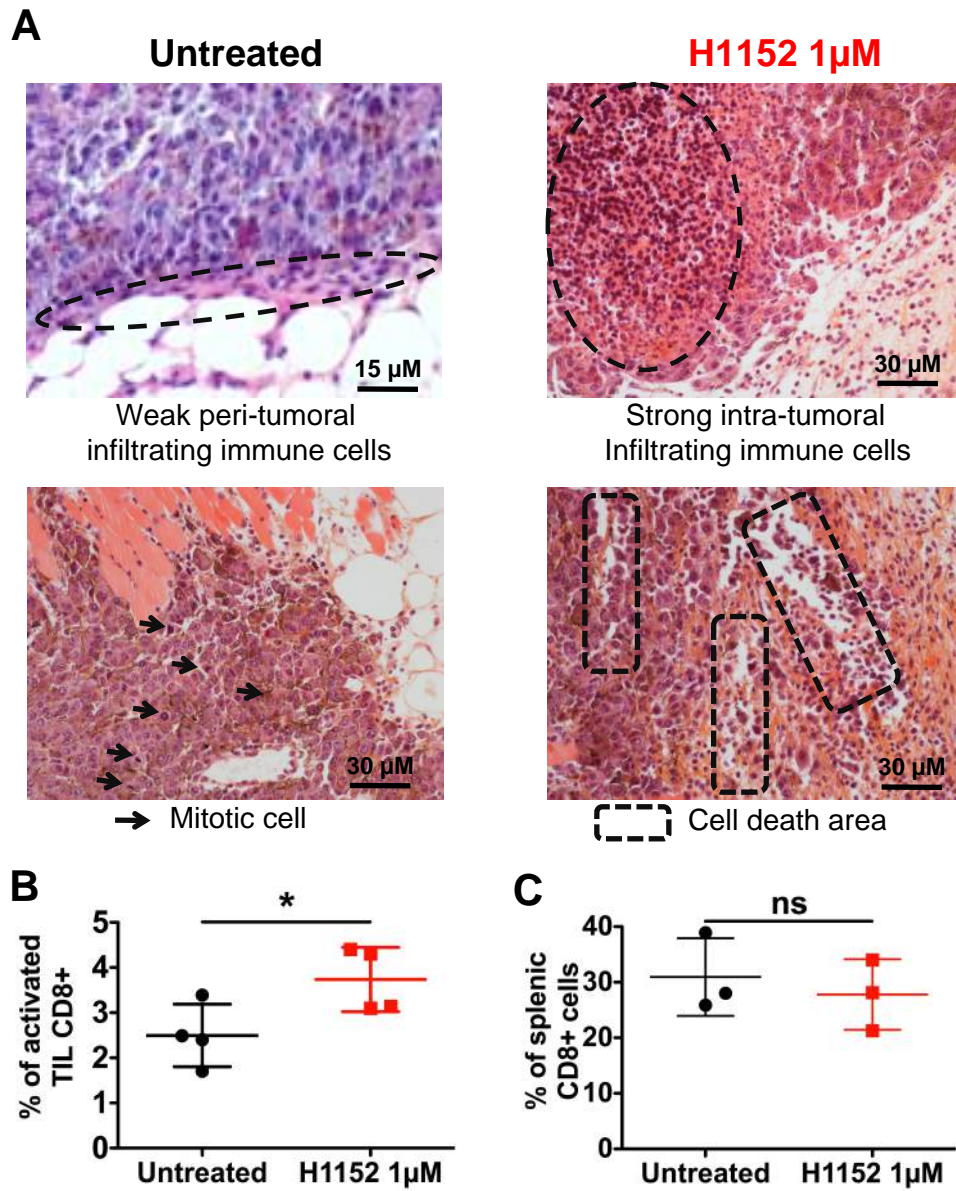


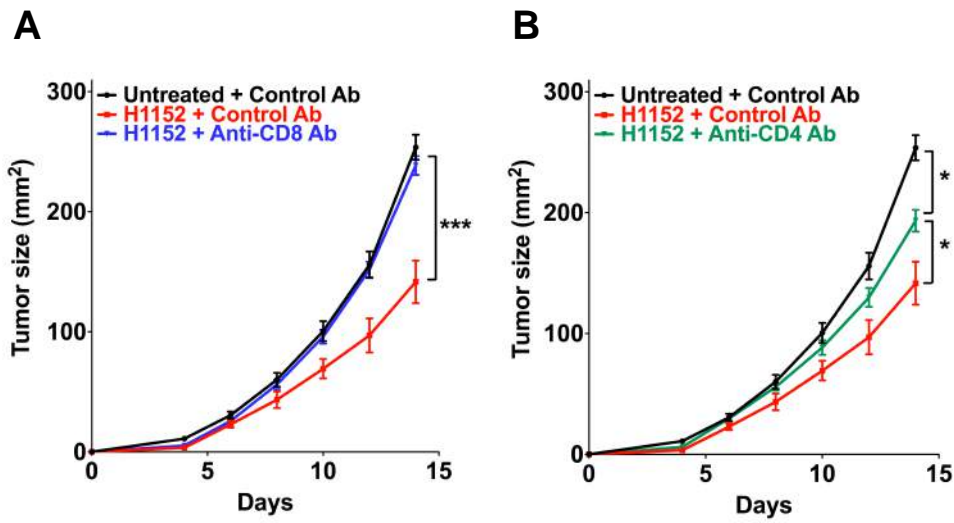
Figure 3



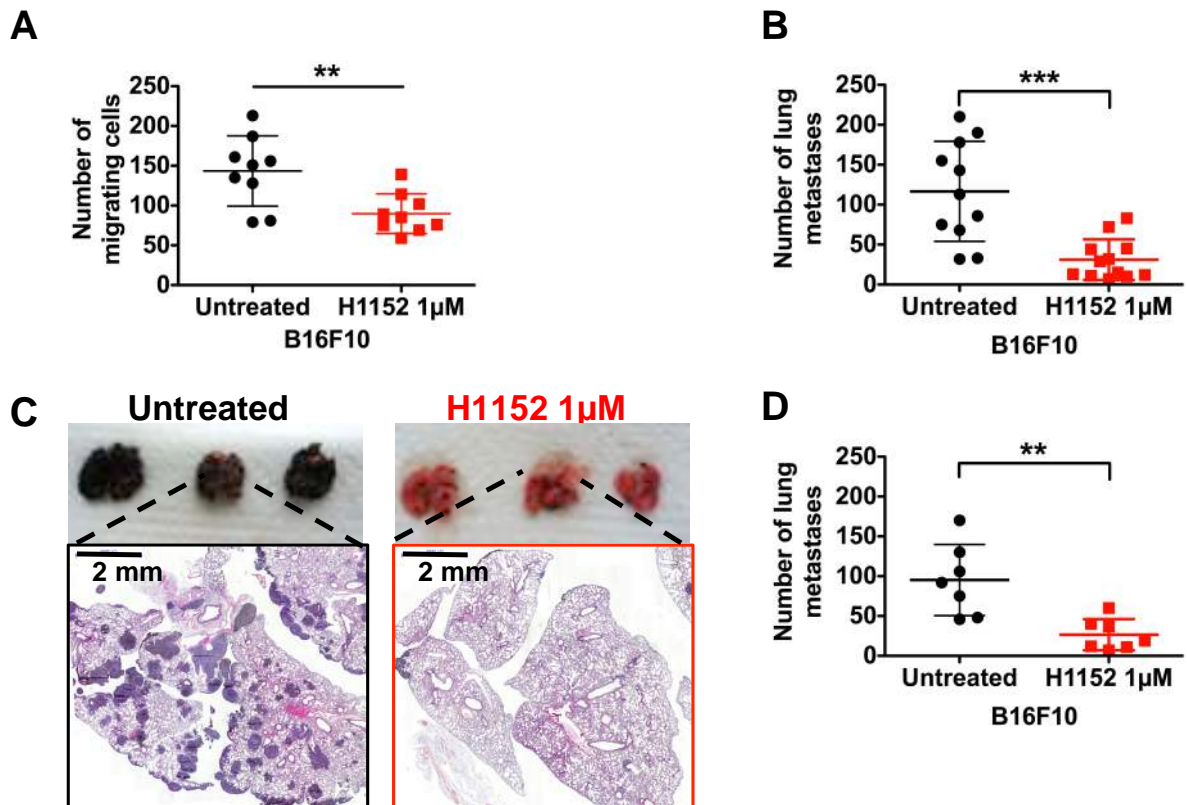
**Figure 4**



**Figure 5**



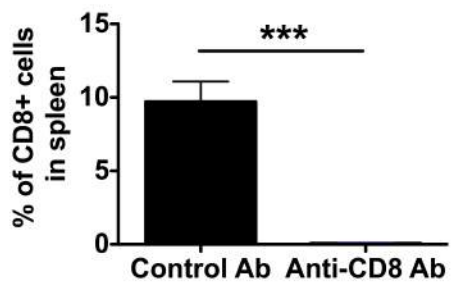
**Figure 6**



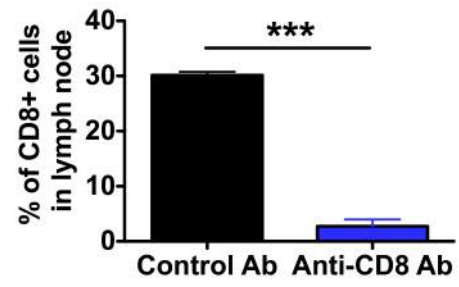


# Figure S1

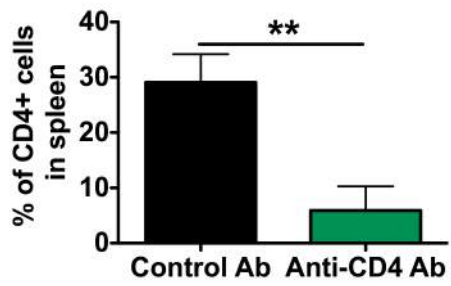
**A**



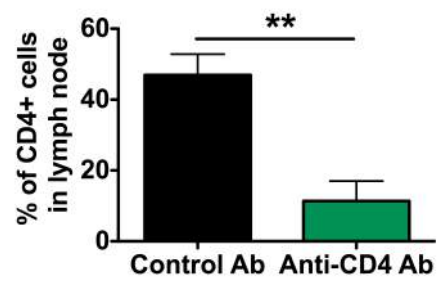
**B**



**C**



**D**





# DISCUSSION ET CONCLUSION

---

## **1) Le ciblage de la voie des GTPases Rho par les statines favorise une réponse immune innée anti mélanome.**

Nous avons étudié l'intérêt potentiel de l'inhibition des GTPases Rho dans la mise en place de la réponse immune innée anti mélanome en nous focalisant sur leur rôle dans l'expression tumorale du ligand activateur MICA. MICA est exprimé sur les cellules tumorales, dont les mélanomes, et sa forme membranaire participe à l'activation des cellules NK et à la costimulation des LT (Cerwenka & Lanier, 2003). A l'inverse, sa forme soluble clivée par des MMP (ADAM-10, MMP14) est impliquée dans l'échappement tumoral (Chitadze et al, 2013a; Chitadze et al, 2013b). En effet, l'interaction entre MICA soluble et le récepteur NKG2D, qui est exprimé sur les cellules NK et les LT activés, entraîne l'internalisation du récepteur et sa dégradation. Ainsi, les cellules NK et LT qui arrivent au site tumoral expriment moins de NKG2D et sont par conséquent moins efficaces (Paschen et al, 2009).

Des études antérieures de l'équipe avaient mis en évidence une régulation positive des molécules de costimulation (CD80 et CD86) et du CMH-I par l'Atorvastatine sur des cellules de mélanome (Sarrabayrouse et al, 2010; Tilkin-Mariame et al, 2005). Ces surexpressions favorisaient la réponse immune adaptative anti tumorale. Nous avons alors voulu analyser la capacité de l'Atorvastatine à favoriser également la réponse immune innée anti mélanome. C'est pourquoi nous avons étudié la régulation de l'expression de MICA sur trois des neuf lignées de mélanome métastatique que nous possédons (LB1319-MEL, BB74-MEL et LB39-MEL) après traitements à l'Atorvastatine. Nous avons observé que ces traitements induisaient une augmentation d'expression membranaire de MICA sur les lignées LB1319-MEL et BB74-MEL, alors que sur la lignée LB39-MEL on observe une diminution de MICA membranaire. Nous avons essayé de déterminer le type de régulation de MICA induite par l'Atorvastatine. La littérature décrit que MICA possède différents niveaux de régulation : au niveau de sa transcription, de son transport à la membrane ou de son clivage en membrane et par l'implication d'un miRNA, (Elsner et al, 2010; Fuertes et al, 2008; Yadav et al, 2009; Yang et al, 2014). Nos expériences d'immunoempreinte et d'ELISA ont exclu toute régulation au niveau de sa traduction et de son clivage pour les cellules BB74-MEL et LB39-MEL. Par contre, pour la lignée LB1319-MEL, nous avons observé une augmentation des protéines MICA totales suite au traitement par l'Atorvastatine. Cette augmentation pourrait être la conséquence d'une augmentation de la traduction ou de la transcription de MICA, ou de la stabilité des protéines ou des ARNm. Cet aspect reste à

déterminer car nous n'avons pas réussi à avoir assez de résultats pour obtenir une valeur statistiquement valable. Ainsi, pour trancher il faudra utiliser des inhibiteurs de la transcription, comme l'actinomycine D, combinés au traitement par l'Atorvastatine et mesurer la stabilité de l'ARNm par RT-qPCR ou encore par des essais rapporteur à activité luciférase pour tester l'activité du promoteur de MICA. Nos résultats actuels nous permettent seulement de savoir que la régulation de l'expression de MICA induite par l'Atorvastatine est complexe et différente dans plusieurs lignées de mélanomes humains.

En nous concentrant sur la lignée LB1319-MEL, nous avons étudié la voie de signalisation qui régule MICA après traitement à l'Atorvastatine. Nous nous sommes naturellement orientés vers la voie des GTPases Rho. En effet, les statines sont connues pour inhiber l'activité de ces protéines en ciblant leur prénylation. De plus, nous avons précédemment montré que, dans la lignée LB1319-MEL, la régulation de l'expression des molécules du CMH-I et de costimulation CD86 par les statines se faisait via les GTPases Rho. Nous avons inhibé ces GTPases avec des systèmes d'inhibitions spécifiques pharmacologiques ou par ARN interférence. De façon inattendue, RhoA ne régule pas l'expression de MICA et les GTPases Ras, Rac1, RhoB et RhoC sont toutes des protéines régulatrices positives de l'expression membranaire de MICA. L'inhibition de ces GTPases devrait donc inhiber l'expression de MICA au lieu de l'amplifier. Ces GTPases ne semblent donc pas impliquées dans la surexpression de MICA induite par l'Atorvastatine sur les cellules LB1319-MEL. D'autres données de la littérature montraient que la voie des PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors) pouvait être modulée par les statines (Balakumar & Mahadevan, 2012). Nos expériences d'inhibition de PPAR $\gamma$  ou des essais de gène rapporteur ont montré que PPAR $\gamma$  et la voie SAPK/JNK sont impliqués dans la surexpression de MICA induite par l'Atorvastatine dans les cellules LB1319-MEL.

Les protéines PPARs sont des facteurs de transcription principalement impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides. Des agonistes de PPARs ont été développés pour le traitement de maladies cardiovasculaires ou du diabète (Wilding, 2012). Mais récemment, plusieurs travaux ont montré que ces agonistes des PPARs (comme les thiazolidinediones ou des dérivés de prostaglandines) ont une activité anti mélanome *in vitro* et *in vivo* (Botton et al, 2009). En effet, ils sont capables d'inhiber le cycle cellulaire ou de favoriser l'apoptose (Paulitschke et al, 2012; Wasinger et al, 2014). Nous avons montré que l'activation de PPAR $\gamma$  était nécessaire pour la surexpression de MICA induite par l'Atorvastatine. Ces résultats suggèrent que ces agonistes des PPARs, en plus de leur activité cytostatique, pourraient aussi avoir une activité anti mélanome en modulant le volet immun.

Par la suite, nous avons voulu étudier les effets fonctionnels *in vivo* de la surexpression de MICA induite par l'Atorvastatine. En isolant des cellules NK murines, nous avons montré que cette surexpression de MICA sur les LB1319-MEL les rendait plus sensibles à la lyse médiée par les cellules NK lorsque ces cellules sont mises en coculture. Il faut rappeler que l'utilisation de cellules

NK murines dans nos expériences est possible car MICA est un ligand reconnu par les récepteurs NKG2D humains et murins et qu'il est fonctionnel dans les deux modèles (Cerwenka & Lanier, 2001). Nos expériences *in vivo* en souris Nude ont mis en évidence que la surexpression de MICA induite après le prétraitement des cellules LB1319-MEL avec de l'Atorvastatine provoque d'une part un ralentissement significatif de la croissance tumorale sous-cutanée, et d'autre part une diminution de leur capacité à induire des métastases pulmonaires. Ces résultats suggèrent que les cellules NK des souris Nude parviennent à mieux contrôler le développement des mélanomes lorsque ceux-ci surexpriment MICA membranaire suite au traitement par l'Atorvastatine.

Ces résultats sont cohérents avec les données scientifiques qui mettent en avant l'importance des cellules NK dans le contrôle actif du processus métastatique (Mehlen & Puisieux, 2006). Néanmoins, notre protocole d'induction de métastases est imparfait car il se base sur l'injection des cellules dans la veine caudale. Donc cela ne mime que les étapes finales du processus métastatique : la survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine, l'extravasation et la colonisation d'un organe à distance. Il faudrait aussi étudier l'effet des statines sur les étapes plus précoces de la métastase en réalisant par exemple des injections intra-auriculaires des cellules de mélanome (Nicolson et al, 1978). Dans ce protocole, les cellules tumorales se développent d'abord sur le site de l'injection, puis elles métastasent vers les ganglions drainants.

Pour le moment, les expériences effectuées prouvent uniquement que l'action des statines induit une diminution de l'implantation des métastases. Or, nous voudrions savoir si la surexpression de MICA est elle-même à l'origine de cet effet. Pour répondre à cette question, nous pourrions dépléter complètement l'expression de MICA sur nos cellules de mélanome par un shRNA et les réinjecter *in vivo* après prétraitement à l'Atorvastatine. Pour conclure sur l'implication réelle des cellules NK dans notre modèle, on pourrait aussi réaliser nos expériences dans des souris NSG (NOD-scid-gamma) ne possédant ni LT, ni LB, ni NK (Shultz et al, 2011) ou encore dans des souris mutées pour le récepteur NKG2D (Guerra et al, 2008).

La première étude portant sur la régulation de MICA par les statines (Résultats n°1, Pich *et al.*, 2013) est basée principalement sur la lignée LB1319-MEL. Or celle-ci s'est montrée peu efficace pour générer des tumeurs palpables ou des métastases pulmonaires clairement identifiables après inoculation *in vivo*. C'est la raison pour laquelle, nous avons utilisé la lignée WM-266-4 pour la suite des travaux (Résultats n°2). En effet, ces cellules de mélanome présentent une prolifération plus importante et facilement observable *in vivo* et elles peuvent générer les métastases pulmonaires quantifiables. Ce modèle s'est donc montré plus favorable pour étudier l'effet de la surexpression de MICA et de l'Atorvastatine sur la réponse immune innée induite *in vivo* contre le développement du mélanome.

Notre modèle d'inoculation des cellules humaines de mélanome dans des souris NMRI nu/nu ne permet que d'étudier l'implication de la réponse innée en particulier vis-à-vis de la surexpression de MICA. Si, on avait voulu étudier le rôle de d'autres effecteurs immuns (LT ou LB), il aurait été nécessaire de travailler sur des modèles de mélanomes murins syngéniques à des souris disponibles au laboratoire. Il s'avère que la lignée de mélanome B16F10 est communément utilisée car elle est syngénique à la souche murine C57BL/6 et elle est très agressive comme les mélanome métastatiques humains. De plus, nous possédons aussi au laboratoire plusieurs lignées cellulaires obtenues à partir du mélanome B16 et caractérisées par des potentiels métastatiques différents (B16F0, B16F1, B16BL6). Des expériences préliminaires réalisées sur B16F10 ont mis en évidence une régulation du ligand RAE-1 (un ligand murin de NKG2D) suite à des traitements à l'Atorvastatine (données non publiées). Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude en analysant les réponses immunes innées et adaptatives *in vivo* induites par les cellules B16F10 surexprimant RAE-1.

L'injection des cellules de mélanome traitées par l'Atorvastatine induit un ralentissement de la croissance tumorale et une baisse du nombre de métastases. Selon toute vraisemblance, ces effets impliquent les cellules NK dont l'activité lytique a été augmentée par la surexpression de MICA. Cependant, l'injection des statines en IP induit également d'autres modifications systémiques qui pourraient interférer avec la réponse innée anti tumorale en particulier en agissant sur les cellules  $T\gamma\delta$ . De plus, il se pourrait que des cellules, autres que les mélanomes, surexpriment aussi MICA et soient donc d'avantage lysées par les cellules NK. Enfin, plusieurs fonctions cellulaires impliquant des GTPases de la famille Ras peuvent être perturbées par ces injections de statine qui inactivent ces GTPases.

De plus, il est connu que les statines réduisent l'invasion cellulaire en inhibant les MMP1, 2, 9 et 14 et les intégrines  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  (Kidera et al., 2010). Ainsi les statines peuvent à la fois combiner deux types d'actions : une modification du microenvironnement immunitaire de la tumeur et une activité inhibitrice intrinsèque sur la migration, ce qui rend ces inhibiteurs intéressants pour des thérapies anti mélanome. Toutefois, il est à noter que dans certaines lignées de mélanome, le traitement par les statines peut induire une diminution de MICA et donc une diminution de la lyse par les cellules NK. C'est pourquoi le développement de telles thérapies contre le mélanome devra préalablement prendre en considération la variabilité des mélanomes de chaque patient.

Les études rétrospectives de consommateurs de statines montrent un intérêt de ces molécules contre le cancer (Ahern et al, 2014; Bockorny & Dasanu, 2015; Lytras et al, 2014). Nous avons vu que la surexpression de MICA, induite par les statines sur 3 des 4 lignées de mélanomes, suggère leur éventuelle utilisation en immunothérapie du mélanome. Puisqu'une de nos lignées dérégule MICA après un traitement aux statines, il serait intéressant de tester dans les mêmes conditions les 11 lignées de mélanome que nous possédons au laboratoire. Le traitement avec des statines module soit

positivement soit négativement l'expression de MICA, ce qui nous permet de différencier deux groupes de mélanome. Nous pourrions alors étudier les différences, qui existent entre ces deux groupes, au niveau de leurs voies métaboliques (PPAR $\gamma$ , Rho) ou de mutations éventuelles. Ces résultats pourraient par la suite permettre de connaître les critères à rechercher pour choisir les patients chez lesquels des traitements aux statines favoriseraient le rejet immun des mélanomes.

Pour finir, il serait intéressant de déterminer s'il y existe une corrélation clinique entre l'expression de MICA et l'évolution des mélanomes ainsi que la survie des patients. Ceci pourrait être fait de façon rétrospective à partir de biopsies de patients dont l'évolution de la maladie est connue. Par la même occasion, nous pourrions aussi étudier une corrélation éventuelle entre la prise de statines, pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes, et la progression clinique des mélanomes.

## **2) CD70 : un marqueur des capacités métastatiques du mélanome régulé par les GTPases Rho**

Le mélanome est à l'heure actuelle une pathologie dont l'incidence ne cesse d'augmenter depuis ces dernières décennies dans le monde (Eggermont et al, 2014). La prise de conscience et les diagnostics précoces permettent de réduire la probabilité de récurrence. Néanmoins, il est difficile d'identifier les patients diagnostiqués pour un mélanome localisé qui vont développer par la suite des métastases (Balch et al, 2012). Ce stade de la maladie est caractérisé par une survie plus courte des patients. De nombreux efforts se sont focalisés sur la recherche de nouveaux marqueurs pronostiques et prédictifs de l'évolution de la maladie.

Nous avons étudié la molécule de costimulation CD70 comme un marqueur potentiel du mélanome métastatique. Diverses études ont montré l'expression ectopique de CD70 sur différentes tumeurs comme les carcinomes rénaux, les cancers hématologiques, les glioblastomes, les cancers du sein ou les carcinomes ovariens (Grewal, 2008; Jilaveanu et al, 2012; Petrau et al, 2014; Wischhusen et al, 2002). Nos travaux décrivent pour la première fois clairement l'expression de CD70 sur des mélanomes humains. Sur notre panel de biopsies, l'expression de CD70 est présente sur quasiment toutes les tumeurs primitives, mais elle est fortement diminuée dans les stades métastatiques. Nous avons confirmé cette diminution de CD70 au cours de la progression du mélanome grâce à trois lignées tumorales obtenues à partir d'un même patient mais à différents stades de la maladie et à plusieurs années d'intervalle.

Le rôle de CD70 dans les tumeurs fait l'objet de controverses. D'une part, dans des glioblastomes murins, CD70 induirait une apoptose des lymphocytes favorisant ainsi l'échappement tumoral (Wischhusen et al, 2002). D'autre part, CD70 pourrait au contraire induire une immunité protectrice contre des glioblastomes humains (Aulwurm et al, 2006). Notre équipe avait aussi précédemment

montré que l'expression ou la sécrétion de CD70 par des cellules de carcinome mammaire murin favorisait la mise en place d'une réponse immune protectrice (Cormary et al, 2004; Cormary et al, 2005).

Nos expériences actuelles *in vitro* avec des lignées de mélanomes humains semblent aussi en faveur d'un rôle protecteur de CD70. Sa présence est associée à une diminution des capacités migratoires et invasives des cellules de mélanome. Pour comprendre véritablement l'importance de CD70 dans ces tumeurs humaines, il serait judicieux de corrélérer l'étude de l'expression de CD70, non plus avec le stade de la maladie, mais avec la survie des patients. Cependant, cette étude est difficile car le diagnostic de mélanome chez les patients survient parfois précocement et parfois tardivement sans qu'on puisse savoir depuis combien de temps la tumeur est apparue. Néanmoins, des études rétrospectives de marquages, avec l'anticorps anti-CD70, de biopsies provenant de patients dont on connaît l'évolution clinique et la survie, pourraient permettre de savoir s'il existe un lien entre l'expression tumorale de CD70 et l'évolution du mélanome. De telles études ont déjà été faites dans les carcinomes rénaux et mammaires (Jilaveanu et al, 2012; Petrau et al, 2014). Mais elles ont montré qu'à l'inverse du mélanome, CD70 est plus exprimé dans les stades avancés et peut être corrélé, dans certains cas, à une survie des patients plus courte.

De plus, une étude récente a montré que l'expression de CD70 est associée à la résistance *in vitro* de plusieurs lignées de carcinome ovarien vis-à-vis d'un traitement au cisplatine. (Liu et al, 2013). Il serait intéressant de savoir si, dans le mélanome, CD70 pourrait être un marqueur prédictif de réponse à des chimiothérapies classiques comme la Dacarabazine. Concernant les chimiothérapies ciblées comme le Vémurafénib, qui cible la mutation BRAFV600E, nous avons montré que son activité inhibitrice de la voie BRAF/MEK n'était pas affectée par la présence ou l'absence de CD70 sur les cellules de mélanome LB1319-MEL, non mutées en BRAFV600E et WM-266-4, qui sont mutées en BRAFV600E.

Nous avons étudié la régulation de l'expression de CD70 dans les mélanomes. Par des systèmes d'inhibition de plus en plus spécifiques, nous avons constaté que seule la GTPase RhoA, contrairement à ses homologues RhoB et RhoC, régulait positivement l'expression de CD70 au niveau de la transcription et de la traduction. Il serait intéressant de savoir quels effecteurs de RhoA peuvent être impliqués dans cette régulation de CD70. Ses effecteurs les plus connus sont les protéines ROCK, mDia ou Citron, mais elles sont plutôt connues pour remodeler le cytosquelette cellulaire (Thumkeo et al, 2013). Par contre d'autres effecteurs de RhoA, tels que PLC $\gamma$ 1 et PKC $\alpha$ , sont connus pour agir sur la transduction du signal et des seconds messagers et ils pourraient donc participer à la régulation de la transcription de CD70 (Bustelo et al, 2007). L'utilisation d'inhibiteurs et de siRNA spécifiques serait nécessaire pour tester leur implication réelle.



De plus, nous avons montré que d'une part la GTPase RhoA et d'autre part la voie de signalisation des MAPK (BRAF/MEK/ERK) régulent positivement et de façon liée la régulation de CD70 dans les mélanomes. Cette régulation exercée par BRAF est d'autant plus intéressante, qu'il existe des inhibiteurs de BRAF efficaces en clinique, le Dabrafénib et le Vémurafénib (PLX-4032) qui ciblent BRAF mutée à la position V600E. Nous avons fait séquencer l'exon 15 de BRAF dans nos lignées de mélanome LB1319-MEL, LB39-MEL CD70+ et WM-266-4 pour savoir si ces cellules présentaient la mutation BRAF V600E (Séquençages réalisés par le Dr Laurence Lamant de l'IUCT). Les résultats obtenus montrent que LB1319-MEL ne présente pas la mutation V600E, par contre LB39-MEL CD70+ et WM-266-4 sont mutés en BRAF V600E. De façon attendue, le PLX-4032 s'est montré plus efficace pour inhiber l'expression de CD70 dans les lignées mutées en BRAF V600E par rapport à celle qui ne l'était pas. Néanmoins, le PLX-4032 peut quand même inhiber, mais moins efficacement, la voie BRAF dans les cellules LB1319-MEL dont l'activation basale de la voie des MAPK est importante. Ceci suggère que, dans les cellules LB1319-MEL, soit BRAF porte une autre mutation activatrice, soit Ras, en amont de BRAF, porte une mutation qui induit une activation constitutive de la voie des MAPK. Ainsi, le séquençage d'autres exons de BRAF (notamment l'exon 11) et de RAS serait nécessaire pour confirmer ces hypothèses. Mais une information importante apportée par notre travail est que l'expression de CD70 ou sa dérégulation, induite par un siRNA spécifique, ne modifie pas la prolifération des cellules tumorales et n'interfère pas avec l'activité anti tumorale du Vémurafénib.

Enfin, l'inhibition simultanée de RhoA et de la voie BRAF/MEK/ERK, n'a pas permis la complète extinction de CD70 à la membrane des cellules LB1319-MEL. Ainsi les voies BRAF et RhoA sont nécessaires pour avoir une bonne expression de CD70, mais elles ne sont pas suffisantes pour induire son expression. L'hypothèse serait qu'un troisième partenaire est impliqué dans l'expression de CD70. Néanmoins, celui-ci reste à déterminer car ni l'inhibition par ARN interférence de la voie AKT ni celle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B n'a montré de modification de l'expression de CD70 (résultats non montrés dans ce manuscrit). Une autre hypothèse est que l'expression de CD70 dans les mélanomes pourrait être liée à des mécanismes génétiques et épigénétiques. En effet, Bertrand et ses collaborateurs ont mis en évidence différents mécanismes moléculaires responsables de la perte d'expression de CD70 dans des lymphomes diffus à grandes cellules B (Bertrand et al, 2013). Ils ont trouvé une délétion de la région chromosomique 19p13, contenant le gène codant pour CD70, dans 21% des cas. Les mêmes travaux ont aussi montré que certaines mutations génétiques ou une hyperméthylation du promoteur de CD70 induisaient sa dérégulation. Enfin, une hyperméthylation du promoteur de CD70 a aussi été rapportée dans des carcinomes mammaires (Petrau et al, 2014; Yu et al, 2010). Ces voies de régulation de l'expression de CD70 constituent des pistes à étudier pour expliquer l'expression ou non de CD70 sur le mélanome.

Malgré le fait que CD70 soit une molécule de costimulation lymphocytaire (Garcia et al, 2004), et que des travaux précédents de l'équipe aient mis en évidence une protection immune induite par CD70 dans des carcinomes mammaires, nous n'avons pas pu montrer de fonction immunologique de CD70 avec nos lignées de mélanome.

Mais de façon inattendue, nous avons montré que CD70 régule les capacités migratoires et invasives de nos lignées de mélanome. En effet, l'expression de CD70 sur plusieurs lignées humaines ou murines induit une diminution de la migration et de l'invasion *in vitro* de ces cellules. De plus, cet effet est inversé en présence d'un anticorps anti-CD70 activateur (MoAb : QA32) (Garcia et al, 2004). Nous avons supposé que dans nos modèles ces effets de CD70 sur la motilité cellulaire pourraient être dépendants de l'interaction CD27/CD70. Néanmoins, nous avons infirmé cette hypothèse car d'une part nos lignées de mélanome n'expriment pas le récepteur CD27 en membrane, et d'autre part l'Ac QA32 n'induit pas l'expression de CD27 sur nos lignées. Enfin, une analyse de la signalisation induite par l'anticorps QA32 a montré que la forme monomérique de CD70 régulait négativement l'activation de la voie BRAF/MEK/ERK/RhoE, aboutissant à l'inhibition de la migration cellulaire. A l'inverse, la liaison de l'Ac QA32 favorise la formation des trimères de CD70 ce qui libère la voie BRAF/MEK/ERK/RhoE et induit son activation. L'implication de MEK a bien été prouvée puisque son inhibition par l'inhibiteur spécifique U0126 empêche la migration induite par l'Ac QA32. Il reste à confirmer l'implication de la GTPase RhoE dans le contrôle de la migration cellulaire exercé par CD70. Pour cela, il faudrait inhiber dans des cellules de mélanome RhoE avec des siRNA spécifiques et analyser l'impact sur la migration et les capacités métastatiques. L'implication des métalloprotéases dans la signalisation induite par CD70 devrait aussi être étudiée, car ces protéines sont connues pour être impliquées dans la migration et l'invasion des cellules tumorales (Moro et al, 2014). De plus, certaines d'entre elles peuvent être régulées par BRAF (Weiss et al, 2012; Whipple & Brinckerhoff, 2014), RhoE (Zhou et al, 2013) ou par des protéines de la famille du TNF à laquelle appartient CD70. Nous avons montré que la signalisation propre au ligand CD70 induit une modulation de la motilité cellulaire dans nos mélanomes via la voie BRAF/MEK/ERK/RhoE. La littérature concernant la signalisation en aval du ligand CD70 est pour l'instant limitée à quelques protéines : la voie MAPK, PI3K/Akt ou encore PLC $\gamma$  (Garcia et al, 2004). Dans notre étude, nous avons montré que la voie BRAF/MAPK est la voie de signalisation initié par la trimérisation de CD70 pour favoriser la migration et l'invasion des cellules de mélanome.

A l'heure actuelle, différentes thérapies basées sur des anticorps anti-CD70 bloquants sont à l'étude des thérapies anti tumorales (Grewal, 2008). Différents anticorps anti-CD70 (LD6, Ki-24, SNG-70) ont montré des effets anti tumoraux dans des lymphomes par induction d'ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) ou de cytotoxicité induite par le complément (McEarchern et al, 2007; McEarchern et al, 2008). Concernant les tumeurs solides, des anticorps anti-CD70 sont conjugués à diverses drogues cytotoxiques afin d'adresser plus spécifiquement ces drogues vers les cellules

tumorales exprimant CD70 (Jeffrey et al, 2006). Néanmoins, toutes ces thérapies ne sont utilisables que pour les tumeurs exprimant fortement CD70 dans les stades avancés de la maladie. Or, dans le mélanome, nous avons montré que CD70 était dérégulé au cours de la progression de la maladie. Donc l'utilisation d'Ac anti-CD70 comme thérapie ciblée ne devrait être envisagée que pour certains types de cancer. Et surtout, nous avons prouvé que l'induction de la forme trimérique de CD70 par liaison d'un Ac anti-CD70 (QA 32) favorise la migration. Dans ce contexte, la recherche d'anticorps thérapeutiques qui empêcheraient la trimérisation de CD70 pourrait être envisagée pour une thérapie contre le mélanome métastatique. Par contre des anticorps qui favoriseraient cette trimérisation, comme l'Ac QA32, sont à éviter car ils favoriseraient l'invasion tumorale et les métastases.

### **3) Régulation de FasL par les ROCK et contrôle des réponses immunes anti mélanome**

La protéine FasL joue un rôle important dans les réponses immunes cytotoxiques. Elle est exprimée à la surface de lymphocytes T et de cellules NK suite à leur activation (Lettau et al, 2010). Néanmoins, plusieurs études ont mis en évidence une expression ectopique de FasL sur des cellules tumorales (Hahne et al, 1996; Kykalos et al, 2012). Dans ces contextes tumoraux, FasL jouent des rôles contradictoires favorisant soit le développement soit le rejet tumoral. Ainsi, FasL intervient comme une molécule effectrice d'un mécanisme d'échappement tumoral appelé la contre-attaque tumorale (Igney & Krammer, 2005). Cependant une forte expression de FasL membranaire favorise de développement d'une réponse inflammatoire et immune anti tumorale.

Des travaux précédents de l'équipe ont mis en évidence que la voie RhoA/ROCK exerce un contrôle négatif sur l'expression membranaire de FasL à la surface des cellules d'une lignée de mélanome murin : B16F10 (Sarrabayrouse et al, 2007). Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux effets *in vivo* de la surexpression membranaire de FasL induite dans B16F10 par l'utilisation d'un inhibiteur des kinases ROCK, le H1152. Les travaux précédents de l'équipe avaient montré que des inhibiteurs pharmacologiques des GTPases Rho favorisent la mise en place de réponses immunes anti mélanome (Sarrabayrouse et al, 2010; Tilkin-Mariame et al, 2005). Mon travail de thèse suggère que le H1152, un inhibiteur spécifique des effecteurs de RhoA, les kinases ROCK-I et ROCK-II, présente un intérêt thérapeutique potentiel car il induit une surexpression membranaire de FasL qui permet un ralentissement tumoral lié à l'action d'effecteurs immuns.

La régulation négative de FasL induite par les kinases ROCK n'agit que sur l'expression membranaire FasL. Donc pour mieux comprendre cette signalisation, il faudrait s'intéresser aux modifications post-traductionnelles de FasL. D'une part, après traduction, FasL est stocké dans des lysosomes sécrétoires

intracellulaires pour ensuite être adressé à la membrane (Blott et al, 2001). Or ROCK est connu pour être impliqué dans le métabolisme des microtubules (Schofield et al, 2013) et dans le trafic des lysosomes (Nishimura et al, 2003) (Lettau et al, 2010). Ainsi, nous devrions étudier l'effet de l'inhibition des ROCK sur le transport vésiculaire de FasL. On pourrait par exemple analyser par microscopie confocale la répartition et la colocalisation de FasL avec les marqueurs lysosomiaux LAMP-1 ou Cathepsin-D dans les cellules B16F10 après traitement au H1152. D'autre part, FasL membranaire est clivé par des métalloprotéases comme MMP-7 ou ADAM-10 (Mitsiades et al, 2001; Schulte et al, 2007) et il a été rapporté que ROCK régule l'activité des métalloprotéases notamment MMP-2 et MMP-9 (Sun et al, 2015). Nos expériences préliminaires ont montré qu'un inhibiteur pan-MMP (la phénanthroline) est capable d'induire une surexpression de FasL en membrane sur les B16F10. Il serait intéressant de poursuivre cette étude en testant la capacité du H1152 à moduler l'activité de MMP-7 ou ADAM-10 *in vitro* par des tests fonctionnels enzymatiques ou par immunoempreinte.

D'autre part, l'analyse des tumeurs sous-cutanées provenant des cellules B16F10 a révélé une très forte expression de FasL *in vivo* par rapport aux mêmes cellules *in vitro* et ceci pour l'expression membranaire ou en protéines totales (résultats non montrés dans ce manuscrit). Les mécanismes responsables de cette forte expression *in vivo* restent à élucider, que ce soit à un niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel de FasL.

Il faudrait aussi préciser les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans la surexpression de FasL induite par le H1152. Nous pourrions discriminer l'implication d'une ou des deux isoformes de ROCK (ROCK-I ou ROCK-II) par ARN interférence. L'analyse de l'implication éventuelle de certains effecteurs des protéines ROCK, tels que la Myosine Phosphate Target 1 (MYPT-1) ou la Myosine Light Chain (MLC) serait également intéressante (Chu et al, 2012).

Notre travail est davantage focalisé sur l'impact *in vivo* des traitements au H1152. Nos expériences *in vivo* en souris syngéniques C57BL/6 ont montré que la surexpression de FasL induite par un prétraitement au H1152 des cellules B16F10 engendre un ralentissement de la croissance de ces tumeurs. Cet effet est dépendant d'une infiltration de lymphocytes T (LT) effecteurs ayant une activité médiée par l'IFN- $\gamma$ . Nous avons tenté de caractériser d'avantage ces lymphocytes et nous avons montré que les LT CD8 activés jouent un rôle majoritaire. En effet la déplétion *in vivo* sélective des cellules CD8+ avec un anticorps neutralisant est suffisante pour renverser l'effet de la surexpression de FasL sur la croissance tumorale. Par contre, la déplétion des cellules CD4+ a montré un effet intermédiaire. Celui-ci peut être expliqué par la diversité des sous-populations des LTCD4+ notamment avec les LT helper et les LT régulateurs (Treg). D'autant plus qu'il a été montré, avec des cellules B16F10 transfectées pour FasL, que les Treg limitent la réponse inflammatoire médiée par les neutrophiles qui sont en grande partie responsable du contrôle sur la croissance tumorale. Il serait donc nécessaire d'étudier le rôle des Treg dans notre modèle de surexpression de FasL induite par le H1152.

Pour cela, nous pourrions dépler sélectivement les Treg *in vivo* avec un anticorps anti-CD25 neutralisant (Richards et al, 2010) ou analyser les Treg dans l'infiltrat intra-tumoral. De plus, les analyses de l'infiltration immune intra-tumoral pourrait être précisée. La présence d'effecteurs cytotoxiques spécifiques anti tumoraux pourrait être recherchée en réalisant des co-marquages CD3/CD8 avec un tétramère H-2Kb/TRP-2. En effet, les cellules B16F10 expriment un peptide immunodominant provenant de l'antigène de tumeurs TRP-2 et présenté à la membrane par la molécule H2Kb du CMH-I (Sarrabayrouse et al, 2010). De plus, des analyses des profils cytokiniques nous permettraient de savoir si ces lymphocytes infiltrant favorisent le rejet ou la prolifération tumorale. Pour cela grâce à des marquages intra cytoplasmiques des lymphocytes infiltrant les tumeurs, nous étudierions leurs sécrétions de cytokines de type Th1 (IL2, IFN- $\gamma$ , IL12) ou de type Th2 (IL4, IL10, TGF- $\beta$ ).

L'inhibiteur H1152 est une molécule dérivée d'un autre inhibiteur des protéines ROCK, appelé HA-1077, qui est utilisé en clinique dans des thérapies cardiovasculaires sous le nom de Fasudil (Suzuki et al, 2008). Il existe également un autre inhibiteur des protéines ROCK fréquemment utilisé dans la littérature, le Y27632 (Routhier et al, 2010). Pour tester l'intérêt éventuel de ces inhibiteurs de ROCK en thérapie anti mélanome, nous pourrions étudier la capacité de ces inhibiteurs à induire directement *in vivo* un ralentissement de la croissance tumorale. Nos expériences *in vitro* ont montré que, comme pour le H1152, que ces deux inhibiteurs peuvent induire une surexpression dose-dépendante de FasL membranaire sur les cellules B16F10 (résultats non montrés dans ce manuscrit). Néanmoins, nos expériences *in vivo* de suivi de la croissance tumorale, suite à l'injection intrapéritonéale régulière de Fasudil, ont montré des effets trop variables pour conclure sur l'effet préventif ou curatif du Fasudil contre le développement local sous-cutané du mélanome. Il faudrait peut-être réadapter les protocoles d'injection au niveau des dosages et des cinétiques.

L'apparition de métastases de mélanomes influence énormément le pronostic clinique des patients car les traitements actuels sont peu efficaces à ce stade de la maladie. De ce fait, il est nécessaire de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de contrôler la progression des métastases. L'intérêt du Fasudil dans le traitement du mélanome pourrait concerner cette étape métastatique de la maladie. En effet, de nombreuses études, principalement *in vitro*, montrent que le Fasudil réduit la migration et l'invasion diverses lignées de cancer du poumon, des ovaires ou des gliomes (Deng et al, 2010; Ogata et al, 2009; Yang et al, 2012). De plus, l'inhibition des protéines ROCK par d'autres inhibiteurs a été montrée efficace pour réduire les métastases dans un modèle murin de mélanome (Nakajima et al, 2003a; Routhier et al, 2010). De notre côté, nous avons bien montré que l'inhibition des ROCK par le H1152 réduit les capacités migratoires et invasives des cellules de mélanome B16F10 dans les poumons. Ces effets sont principalement dus aux capacités intrinsèques du H1152 en réduisant la migration cellulaire (Narumiya et al, 2009). Cette interprétation est d'ailleurs renforcée car nos

expériences *in vivo* en souris NMRI nu/nu révèlent que les LT de la réponse adaptative ne sont pas impliqués dans cette réduction de métastases. De plus, l'activité intrinsèque pro-invasive de H1152 est renforcée par la surexpression de FasL induite par H1152. En effet, plusieurs études ont rapporté que FasL pouvait induire la migration et l'invasion cellulaire (Cai et al, 2012). Cependant, comme les cellules NK jouent un rôle majeur dans le contrôle des métastases et comme la mutation des souris Nude ne déplete pas la population NK, il n'est pas exclu que l'immunité innée participe au contrôle du développement des métastases suite à l'inhibition des ROCK. Pour tester cela, l'utilisation des souris NSG (Shultz et al, 2011) ou mutées pour l'IFN- $\gamma$  pourrait être envisagée. De plus, l'étude de l'implantation des métastases pulmonaires des cellules B16F10 en souris mutées pour le récepteur Fas (B6/*lpr*) permettrait de savoir si la surexpression de FasL est nécessaire ou non à la réduction des métastases après inhibition des ROCK.

Cependant, ce modèle expérimental de métastases pulmonaires, induites par injections intraveineuses de cellules tumorales, ne prend en compte que les étapes finales du processus métastatique. Pour palier à cet inconvénient, nous avons utilisé un modèle de mélanome murin plus représentatif des mélanomes métastatiques humains. Il s'agit de la lignée B16BL6 qui dérive des cellules B16F10 mais qui possède un potentiel métastatique plus élevé, puisqu'elle induit des métastases ganglionnaires et pulmonaires à partir d'une injection orthotopique intradermique (Hart, 1979). Nous avons mis en évidence une surexpression de FasL, suite au traitement des cellules B16BL6 à une dose de 9  $\mu$ M de H1152. Cette dose nécessaire pour induire la surexpression de FasL est beaucoup plus forte que celle qui est utilisée pour les cellules B16F10 qui est de 1  $\mu$ M. C'est pourquoi, à la concentration de 9  $\mu$ M, la toxicité cellulaire est importante et elle s'accompagne d'une perturbation profonde du cycle cellulaire. Donc, les expériences *in vivo* basées sur la lignée B16BL6 ne peuvent pas être prises en compte pour évaluer la génération de métastases. Une autre option à envisager serait d'injecter les cellules B16F10 prétraitées ou non à 1  $\mu$ M de H1152 en intra auriculaire ce qui permettrait d'obtenir des métastases dans les ganglions drainants à partir d'une tumeur locale (Nicolson et al, 1978).

Enfin récemment, Smit et collaborateurs ont montré que ROCK-I constitue une cible potentielle dans le traitement des mélanomes mutés pour la protéine BRAF (Smit et al, 2014). En effet, par des analyses protéomiques et génomiques à grande échelle, ils montrent que ROCK-I est régulé par un traitement au PLX-4720 (inhibiteur de BRAF). De plus, l'inhibition de ROCK-I favorise la cytotoxicité des inhibiteurs de BRAF et de ERK sur les cellules de mélanome *in vitro*. Ainsi, le ciblage de ROCK semble être prometteur lorsqu'il est combiné aux inhibiteurs de BRAF, qui sont développés à l'heure actuelle pour le traitement du mélanome métastatique. Par conséquent les inhibiteurs de ROCK pourraient être efficaces en thérapie anti mélanome en agissant sur deux volets indépendants. Nous avons montré que ces inhibiteurs favorisent le rejet immun des mélanomes en amplifiant l'infiltration des tumeurs par des LT CD8 et les travaux de Smit et collaborateurs montrent

que l'inhibition de ROCK amplifie l'effet cytotoxique des chimiothérapies ciblées avec les inhibiteurs de BRAF ou de ERK.

L'ensemble de nos travaux montre que des inhibiteurs de la voie RhoA/ROCK favorisent le rejet immun des mélanomes via une surexpression de FasL membranaire et limite le risque de métastases en diminuant l'expression membranaire de CD70, qui peut favoriser l'invasion tumorale si une trimérisation est induite.

Différentes combinaisons thérapeutiques pourraient être envisagées dans l'avenir pour diversifier et améliorer l'arsenal thérapeutique contre le mélanome métastatique.

- Des combinaisons associant des inhibiteurs de ROCK, comme le Fasudil, avec des inhibiteurs de BRAFV600E ou de MEK pourraient allier l'activité anti-proliférative et anti-invasive de ceux-ci avec l'amplification du volet effecteur des réponses immunes anti mélanome et la diminution d'invasivité des métastases induites par l'inhibition de ROCK. Il faudrait tester différentes cinétiques pour savoir si la potentialisation des effets anti-tumoraux est obtenue par administration simultanée ou décalée des différents inhibiteurs. D'autre part il serait important de comparer l'efficacité d'associations entre du Vémurafénib (PLX-4032) ou du Dabrafénib avec les inhibiteurs de ROCK car Schilling et ses collaborateurs ont décrit des différences d'impact du Vémurafénib et du Dabrafénib en ce qui concerne la population de lymphocytes présente dans le microenvironnement tumoral suite au traitement par ces molécules. Aucune différence n'est décrite en terme de survie des patients, mais le Vémurafénib, contrairement au Dabrafénib, diminue le nombre de lymphocytes T CD4+ périphériques, augmente le nombre de lymphocytes T naïfs CCR7+CD45RA+ et diminue le nombre de lymphocytes T mémoires CCR7+CD45RA-. Ces différences pourraient avoir un impact important sur le devenir des patients car les LT mémoires CCR7+CD45RA- sont des effecteurs essentiels pour éviter la récurrence tumorale et cette modification du microenvironnement tumoral pourrait limiter l'efficacité en faveur de la réponse immunitaire induite par les inhibiteurs de ROCK (Schilling et al, 2014).

- Il serait aussi possible de combiner les inhibiteurs de ROCK avec les anticorps anti CTLA-4 ou anti PD-1 ciblant le volet régulateur des réponses immunes anti mélanome. Ces combinaisons permettraient d'induire simultanément une amplification du volet effecteur et une inhibition du volet inhibiteur de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ici aussi il faudrait tester différentes cinétiques pour savoir si l'inhibition de volet régulateur avant l'activation du volet effecteur est ou non plus efficace..





# REFERENCES

## BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Aarntzen EH, De Vries IJ, Lesterhuis WJ, Schuurhuis D, Jacobs JF, Bol K, Schreiber G, Mus R, De Wilt JH, Haanen JB, Schadendorf D, Croockewit A, Blokx WA, Van Rossum MM, Kwok WW, Adema GJ, Punt CJ, Figdor CG (2013) Targeting CD4(+) T-helper cells improves the induction of antitumor responses in dendritic cell-based vaccination. *Cancer Res* **73**(1): 19-29
- Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I, Kopf AW, Polsky D (2004) Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* **292**(22): 2771-2776
- Abe H, Kamai T, Hayashi K, Anzai N, Shirataki H, Mizuno T, Yamaguchi Y, Masuda A, Yuki H, Betsunoh H, Yashi M, Fukabori Y, Yoshida K (2014) The Rho-kinase inhibitor HA-1077 suppresses proliferation/migration and induces apoptosis of urothelial cancer cells. *BMC Cancer* **14**: 412
- Aguirre-Ghiso JA (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* **7**(11): 834-846
- Ahern TP, Lash TL, Damkier P, Christiansen PM, Cronin-Fenton DP (2014) Statins and breast cancer prognosis: evidence and opportunities. *Lancet Oncol* **15**(10): e461-468
- Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH, Umetsu DT (2003) Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* **9**(5): 582-588
- Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, Shindo M, Kobata T, Atsuta M, Morimoto C, Ware CF, Malinin NL, Wallach D, Yagita H, Okumura K (1998) CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* **273**(21): 13353-13358
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**(7): 499-511
- Alan JK, Lundquist EA (2013) Mutationally activated Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* **4**(3): 159-163
- Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH (1993) Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* **178**(6): 2231-223
- Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* **1**(3): 220-228
- Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* **22**(1): 207-220
- Allen JE, El-Deiry WS (2012) Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer Biol Ther* **13**(12): 1143-1151
- Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1999) The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *J Biol Chem* **274**(45): 32418-32424
- Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K (2000) Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* **261**(1): 44-51
- Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S (2002) Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* **195**(10): 1303-1316
- Anvekar RA, Ascioia JJ, Missert DJ, Chipuk JE (2011) Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Front Oncol* **1**(34)
- Arai H, Gordon D, Nabel EG, Nabel GJ (1997) Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13862-13867
- Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N (2014) Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit Rev Immunol* **34**(4): 301-314
- Araki S, Ito M, Kureishi Y, Feng J, Machida H, Isaka N, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T (2001) Arachidonic acid-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflugers Arch* **441**(5): 596-603
- Arens R, Nolte MA, Tesselaar K, Heemskerk B, Reedquist KA, van Lier RA, van Oers MH (2004) Signaling through CD70 regulates B cell activation and IgG production. *J Immunol* **173**(6): 3901-3908

Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* **104**(2): 155-162

Aulwurm S, Wischhusen J, Friese M, Borst J, Weller M (2006) Immune stimulatory effects of CD70 override CD70-mediated immune cell apoptosis in rodent glioma models and confer long-lasting antiglioma immunity in vivo. *Int J Cancer* **118**(7): 1728-1735

Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ, Weichenthal M, Neuber K, Bieber T, Gilde K, Guillem Porta V, Fra J, Bonnetterre J, Saiag P, Kamanabrou D, Pehamberger H, Sufliarsky J, Gonzalez Larriba JL, Scherrer A, Menu Y (2004) Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol* **22**(6): 1118-1125

Awadallah NS, Shroyer KR, Langer DA, Torkko KC, Chen YK, Bentz JS, Papkoff J, Liu W, Nash SR, Shah RJ (2008) Detection of B7-H4 and p53 in pancreatic cancer: potential role as a cytological diagnostic adjunct. *Pancreas* **36**(2): 200-206

Awasthi A, Kuchroo VK (2009) Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* **21**(5): 489-498

Bae SI, Cheriya V, Jacobs BS, Reu FJ, Borden EC (2008) Reversal of methylation silencing of Apo2L/TRAIL receptor 1 (DR4) expression overcomes resistance of SK-MEL-3 and SK-MEL-28 melanoma cells to interferons (IFNs) or Apo2L/TRAIL. *Oncogene* **27**(4): 490-498

Balakumar P, Mahadevan N (2012) Interplay between statins and PPARs in improving cardiovascular outcomes: a double-edged sword? *Br J Pharmacol* **165**(2): 373-379

Balch CM, Balch GC, Sharma RR (2012) Identifying early melanomas at higher risk for metastases. *J Clin Oncol* **30**(13): 1406-1407

Barreira da Silva R, Munz C (2011) Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals. *Cell Mol Life Sci* **68**(21): 3505-3518

Barry M, Bleackley RC (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* **2**(6): 401-409

Bell JL, Haak AJ, Wade SM, Kirchhoff PD, Neubig RR, Larsen SD (2013) Optimization of novel nipepicotic bis(amide) inhibitors of the Rho/MKL1/SRF transcriptional pathway as potential anti-metastasis agents. *Bioorg Med Chem Lett* **23**(13): 3826-3832

Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinie F, Danzon A, Bara S, Bouvier AM, Tretarre B, Binder-Foucard F, Colonna M, Daubisse L, Hedelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadie M, Monnereau A, Troussard X, Faivre J, Collignon A, Janoray I, Arveux P, Buemi A, Raverdy N, Schvartz C, Bovet M, Cherie-Challine L, Esteve J, Remontet L, Velten M (2008) Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* **56**(3): 159-175

Belt EJ, Stockmann HB, Delis-van Diemen PM, Bril H, Tijssen M, van Essen HF, Heymans MW, Belien JA, Carvalho B, Cillessen SA, Meijer GA (2014) Expression of apoptosis regulating proteins identifies stage II and III colon cancer patients with high risk of recurrence. *J Surg Oncol* **109**(3): 255-265

Bennani-Lahlou M, Mateus C, Escudier B, Massard C, Soria JC, Spatz A, Robert C (2008) [Eruptive nevi associated with sorafenib treatment]. *Ann Dermatol Venereol* **135**(10): 672-674

Berger A, Quast SA, Plotz M, Kuhn NF, Trefzer U, Eberle J (2014) RAF inhibition overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis in melanoma cells. *J Invest Dermatol* **134**(2): 430-440

Berndt N, Hamilton AD, Sebti SM (2014) Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **11**(11): 775-791

Bertrand P, Maingonnat C, Penther D, Guney S, Ruminy P, Picquenot JM, Mareschal S, Alcantara M, Bouzeflen A, Dubois S, Figeac M, Bastard C, Tilly H, Jardin F (2013) The costimulatory molecule CD70 is regulated by distinct molecular mechanisms and is associated with overall survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **52**(8): 764-774

Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L, Levy D, Kubi A, Hovav E, Chermoshniuk N, Shalmon B, Hardan I, Catane R, Markel G, Apter S, Ben-Nun A, Kuchuk I, Shimoni A, Nagler A, Schachter J (2010) Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* **16**(9): 2646-2655

Biburger M, Lux A, Nimmerjahn F (2014) How immunoglobulin g antibodies kill target cells: revisiting an old paradigm. *Adv Immunol* **124**: 67-94

Bichakjian CK, Halpern AC, Johnson TM, Foote Hood A, Grichnik JM, Swetter SM, Tsao H, Barbosa VH, Chuang TY, Duvic M, Ho VC, Sober AJ, Beutner KR, Bhushan R, Smith Begolka W (2011) Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. American Academy of Dermatology. *J Am Acad Dermatol* **65**(5): 1032-1047

Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pages F, Galon J (2010) Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* **22**(2): 215-222

Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, Angell H, Fredriksen T, Lafontaine L, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Becker C, Pages F, Speicher MR, Trajanoski Z, Galon J (2013) Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* **39**(4): 782-795

Biswas SK, Allavena P, Mantovani A (2013) Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol* **35**(5): 585-600

Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**(1): 41-52

Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, Lorz C, Diaz C, Hernandez G, Egado J (2003) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors decrease Fas ligand expression and cytotoxicity in activated human T lymphocytes. *Circulation* **108**(12): 1506-1513

Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM (2001) Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* **114**(Pt 13): 2405-2416

Bockorny B, Dasanu CA (2015) HMG-CoA reductase inhibitors as adjuvant treatment for hematologic malignancies: what is the current evidence? *Ann Hematol* **94**(1): 1-12

Boerma M, Fu Q, Wang J, Loose DS, Bartolozzi A, Ellis JL, McGonigle S, Paradise E, Sweetnam P, Fink LM, Vozenin-Brotos MC, Hauer-Jensen M (2008) Comparative gene expression profiling in three primary human cell lines after treatment with a novel inhibitor of Rho kinase or atorvastatin. *Blood Coagul Fibrinolysis* **19**(7): 709-718

Bohana-Kashtan O, Civin CI (2005) Profiling tumor counterattack: do Fas ligand-containing microvesicles reduce anticancer immunity? *Clin Cancer Res* **11**(3): 968-970

Borst J, Hendriks J, Xiao Y (2005) CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol* **17**(3): 275-281

Botton T, Puissant A, Bahadoran P, Annicotte JS, Fajas L, Ortonne JP, Gozzerino G, Zamoum T, Tartare-Deckert S, Bertolotto C, Ballotti R, Rocchi S (2009) In vitro and in vivo anti-melanoma effects of ciglitazone. *J Invest Dermatol* **129**(5): 1208-1218

Bouralexis S, Findlay DM, Atkins GJ, Labrinidis A, Hay S, Evdokiou A (2003) Progressive resistance of BTK-143 osteosarcoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis is mediated by acquisition of DcR2/TRAIL-R4 expression: resensitisation with chemotherapy. *Br J Cancer* **89**(1): 206-214

Bramhall RJ, Mahady K, Peach AH (2014) Spontaneous regression of metastatic melanoma - clinical evidence of the abscopal effect. *Eur J Surg Oncol* **40**(1): 34-41

Breslow A (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* **172**(5): 902-908

Brint E, O'Callaghan G, Houston A (2013) Life in the Fas lane: differential outcomes of Fas signaling. *Cell Mol Life Sci* **70**(21): 4085-4099

Bruchard M, Ghiringhelli F (2014) [Tumor microenvironment: regulatory cells and immunosuppressive cytokines]. *Med Sci (Paris)* **30**(4): 429-435

Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N (2003) Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* **15**(3): 167-176

Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO (2006) Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* **214**: 73-91

Burnet M (1957) Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* **1**(5023): 841-847

Burnet M (1972) Immunology as scholarly discipline. *Perspect Biol Med* **16**(1): 1-10

Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* **29**(4): 356-370

Cai Z, Yang F, Yu L, Yu Z, Jiang L, Wang Q, Yang Y, Wang L, Cao X, Wang J (2012) Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway. *J Immunol* **188**(12): 5954-5961

Cantrell DA (2003) GTPases and T cell activation. *Immunol Rev* **192**: 122-130

Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM (2002) Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* **169**(8): 4079-4083

Caspi RR (2006) Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev* **213**: 23-35

Cerboni C, Fionda C, Soriani A, Zingoni A, Doria M, Cippitelli M, Santoni A (2014) The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D and DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. *Front Immunol* **4**: 508

Cerwenka A, Lanier LL (2001) Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* **181**: 158-169

- Cerwenka A, Lanier LL (2003) NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* **61**(5): 335-343
- Chahlavi A, Rayman P, Richmond AL, Biswas K, Zhang R, Vogelbaum M, Tannenbaum C, Barnett G, Finke JH (2005) Glioblastomas induce T-lymphocyte death by two distinct pathways involving gangliosides and CD70. *Cancer Res* **65**(12): 5428-5438
- Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**(5475): 2351-2354
- Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X (2002) c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* **21**(14): 3704-3714
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* **364**(26): 2507-2516
- Chardin P (2006) Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(1): 54-62
- Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* **6**(1): 15-25
- Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ (1998) Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* **282**(5394): 1714-1717
- Chen L, Park SM, Tumanov AV, Hau A, Sawada K, Feig C, Turner JR, Fu YX, Romero IL, Lengyel E, Peter ME (2010) CD95 promotes tumour growth. *Nature* **465**(7297): 492-496
- Chen ST, Geller AC, Tsao H (2013) Update on the Epidemiology of Melanoma. *Curr Dermatol Rep* **2**(1): 24-34
- Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z (2013) NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* **10**(3): 230-252
- Cheng R, Cooper A, Kench J, Watson G, Bye W, McNeil C, Shackel N (2015) Ipilimumab-induced toxicities and the gastroenterologist. *J Gastroenterol Hepatol*
- Cherfils J (2014) Arf GTPases and their effectors: assembling multivalent membrane-binding platforms. *Curr Opin Struct Biol* **29**: 67-76
- Chevolet I, Speckaert R, Haspelslagh M, Neyns B, Kruse V, Schreuer M, Van Gele M, Van Geel N, Brochez L (2014) Peritumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression in melanoma: an early marker of resistance to immune control? *Br J Dermatol* **171**(5): 987-995
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**(4): 505-512
- Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O, Kabelitz D (2013a) Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol* **78**(2): 120-129
- Chitadze G, Lettau M, Bhat J, Wesch D, Steinle A, Furst D, Mytilineos J, Kalthoff H, Janssen O, Oberg HH, Kabelitz D (2013b) Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the "a disintegrin and metalloproteases" 10 and 17. *Int J Cancer* **133**(7): 1557-1566
- Chiu HY, Sun GH, Chen SY, Wang HH, Ho MY, Chu CY, Wu WL, Jhou RS, Tsai YL, Huang RT, Sun KH, Tang SJ (2013) Pre-existing Fas ligand (FasL) in cancer cells elicits tumor-specific protective immunity, but delayed induction of FasL expression after inoculation facilitates tumor formation. *Mol Carcinog* **52**(9): 705-714
- Choi JN, Hanlon A, Leffell D (2011) Melanoma and nevi: detection and diagnosis. *Curr Probl Cancer* **35**(4): 138-161
- Choueiri TK, Fay AP, Gray KP, Callea M, Ho TH, Albiges L, Bellmunt J, Song J, Carvo I, Lampron M, Stanton ML, Hodi FS, McDermott DF, Atkins MB, Freeman GJ, Hirsch MS, Signoretti S (2014) PD-L1 Expression in Non-clear cell Renal Cell Carcinoma. *Ann Oncol*
- Choy MK, Phipps ME (2010) MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med* **16**(3): 97-106
- Chu J, Miller CT, Kislitsyna K, Laine GA, Stewart RH, Cox CS, Uray KS (2012) Decreased myosin phosphatase target subunit 1(MYPT1) phosphorylation via attenuated rho kinase and zipper-interacting kinase activities in edematous intestinal smooth muscle. *Neurogastroenterol Motil* **24**(3): 257-266, e109
- Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO (2000) Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**(6795): 532-535
- Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* **29**(3): 705-727

- Claus C, Riether C, Schurch C, Matter MS, Hilmenyuk T, Ochsenbein AF (2012) CD27 signaling increases the frequency of regulatory T cells and promotes tumor growth. *Cancer Res* **72**(14): 3664-3676
- Cooper ZA, Frederick DT, Juneja VR, Sullivan RJ, Lawrence DP, Piris A, Sharpe AH, Fisher DE, Flaherty KT, Wargo JA (2013) BRAF inhibition is associated with increased clonality in tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology* **2**(10): e26615
- Cormary C, Gonzalez R, Faye JC, Favre G, Tilkin-Mariame AF (2004) Induction of T-cell antitumor immunity and protection against tumor growth by secretion of soluble human CD70 molecules. *Cancer Gene Ther* **11**(7): 497-507
- Cormary C, Hiver E, Mariame B, Favre G, Tilkin-Mariame AF (2005) Coexpression of CD40L and CD70 by semiallogenic tumor cells induces anti-tumor immunity. *Cancer Gene Ther* **12**(12): 963-972
- Croft M (2009) The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* **9**(4): 271-285
- Cruvinel Wde M, Mesquita D, Jr., Araujo JA, Catelan TT, de Souza AW, da Silva NP, Andrade LE (2010) Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol* **50**(4): 434-461
- Cui X, Xie Y, Chen M, Li J, Liao X, Shen J, Shi M, Li W, Zheng H, Jiang B (2012) Statin use and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control* **23**(7): 1099-1111
- Cullen SP, Brunet M, Martin SJ (2010) Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ* **17**(4): 616-623
- Curtsinger JM, Gerner MY, Lins DC, Mescher MF (2007) Signal 3 availability limits the CD8 T cell response to a solid tumor. *J Immunol* **178**(11): 6752-6760
- de Snoo FA, Hayward NK (2005) Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Lett* **230**(2): 153-186
- del Campo AB, Kyte JA, Carretero J, Zinchenko S, Mendez R, Gonzalez-Aseguinolaza G, Ruiz-Cabello F, Aamdal S, Gaudernack G, Garrido F, Aptsiauri N (2014) Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma. *Int J Cancer* **134**(1): 102-113
- Demierre MF (2005) Consideration of statins for chemoprevention of cutaneous melanoma. *J Drugs Dermatol* **4**(1): 125-128
- Deng L, Li G, Li R, Liu Q, He Q, Zhang J (2010) Rho-kinase inhibitor, fasudil, suppresses glioblastoma cell line progression in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* **9**(11): 875-884
- Denoed J, Moser M (2011) Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *J Leukoc Biol* **89**(2): 195-203
- Dickens LS, Boyd RS, Jukes-Jones R, Hughes MA, Robinson GL, Fairall L, Schwabe JW, Cain K, Macfarlane M (2012) A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol Cell* **47**(2): 291-305
- Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH (2000) Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* **1**(2): 119-126
- Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH (2001) Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* **413**(6852): 165-171
- Diegmann J, Junker K, Loncarevic IF, Michel S, Schimmel B, von Eggeling F (2006) Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in lymphocytes. *Neoplasia* **8**(11): 933-938
- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* **1**(6): 447-456
- DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF (2010a) B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1183**: 38-57
- DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF (2010b) B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol* **184**(7): 4006-4016
- Disis ML (2010) Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol* **28**(29): 4531-4538
- Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**(1): 11-22
- Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, Robbins PF, Huang J, Citrin DE, Leitman SF, Wunderlich J, Restifo NP, Thomasian A, Downey SG, Smith FO, Klapper J, Morton K, Laurencot C, White DE, Rosenberg SA (2008) Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* **26**(32): 5233-5239
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**(11): 991-998
- Dvorsky R, Blumenstein L, Vetter IR, Ahmadian MR (2004) Structural insights into the interaction of ROCK1 with the switch regions of RhoA. *J Biol Chem* **279**(8): 7098-7104

- Eagle RA, Trowsdale J (2007) Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol* **7**(9): 737-744
- Eggermont AM, Spatz A, Robert C (2013) Cutaneous melanoma. *Lancet* **383**(9919): 816-827
- Ellenbroek SI, Collard JG (2007) Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* **24**(8): 657-672
- Elsner L, Flugge PF, Lozano J, Muppala V, Eiz-Vesper B, Demiroglu SY, Malzahn D, Herrmann T, Brunner E, Bickeboller H, Multhoff G, Walter L, Dressel R (2010) The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *J Cell Mol Med* **14**(4): 992-1002
- Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, Slingluff CL, Jr. (2012) Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res* **72**(5): 1070-1080
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**(6916): 629-635
- Evelyn CR, Bell JL, Ryu JG, Wade SM, Kocab A, Harzdorf NL, Showalter HD, Neubig RR, Larsen SD (2010) Design, synthesis and prostate cancer cell-based studies of analogs of the Rho/MKL1 transcriptional pathway inhibitor, CCG-1423. *Bioorg Med Chem Lett* **20**(2): 665-672
- Evelyn CR, Wade SM, Wang Q, Wu M, Iniguez-Lluhi JA, Merajver SD, Neubig RR (2007) CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling. *Mol Cancer Ther* **6**(8): 2249-2260
- Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT (2008) The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol* **20**(2): 183-189
- Ferguson TA, Griffith TS (2006) A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. *Immunol Rev* **213**: 228-238
- Ferlazzo G, Morandi B (2014) Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol* **5**: 159
- Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A (2011) Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol Biol* **677**: 459-470
- Filipazzi P, Huber V, Rivoltini L (2012) Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **61**(2): 255-263
- Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris HA, 3rd, Falchook G, Algazi A, Lewis K, Long GV, Puzanov I, Lebowitz P, Singh A, Little S, Sun P, Allred A, Ouellet D, Kim KB, Patel K, Weber J (2012a) Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* **367**(18): 1694-1703
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB (2010) Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**(9): 809-819
- Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D (2012b) Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* **367**(2): 107-114
- Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, Mitra D, Boni A, Newton LP, Liu C, Peng W, Sullivan RJ, Lawrence DP, Hodi FS, Overwijk WW, Lizee G, Murphy GF, Hwu P, Flaherty KT, Fisher DE, Wargo JA (2013) BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* **19**(5): 1225-1231
- French RR, Taraban VY, Crowther GR, Rowley TF, Gray JC, Johnson PW, Tutt AL, Al-Shamkhani A, Glennie MJ (2007) Eradication of lymphoma by CD8 T cells following anti-CD40 monoclonal antibody therapy is critically dependent on CD27 costimulation. *Blood* **109**(11): 4810-4815
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**(4): 298-306
- Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, Domaica CI, Rossi LE, Barrio MM, Mordoh J, Rabinovich GA, Zwirner NW (2008) Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **180**(7): 4606-4614
- Fujita T, Teramoto K, Ozaki Y, Hanaoka J, Tezuka N, Itoh Y, Asai T, Fujino S, Kontani K, Ogasawara K (2009) Inhibition of transforming growth factor-beta-mediated immunosuppression in tumor-draining lymph nodes augments antitumor responses by various immunologic cell types. *Cancer Res* **69**(12): 5142-5150
- Galon J, Bindea G, Mlecnik B, Angell H, Lagorce C, Tosi AM, Berger A, Pages F (2014) [Intratumoral immune microenvironment and survival: the immunoscore]. *Med Sci (Paris)* **30**(4): 439-444
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Page C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F (2006)

Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**(5795): 1960-1964

Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA (2012a) Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* **10**: 205

Galon J, Pages F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, Gajewski TF, Ascierto PA (2012b) The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* **10**: 1

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF (2005) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* **41**(1): 28-44

Garcia P, De Heredia AB, Bellon T, Carpio E, Llano M, Caparros E, Aparicio P, Lopez-Botet M (2004) Signalling via CD70, a member of the TNF family, regulates T cell functions. *J Leukoc Biol* **76**(1): 263-270

Garrido C, Algarra I, Maleno I, Stefanski J, Collado A, Garrido F, Garcia-Lora AM (2010) Alterations of HLA class I expression in human melanoma xenografts in immunodeficient mice occur frequently and are associated with higher tumorigenicity. *Cancer Immunol Immunother* **59**(1): 13-26

Garrido C, Paco L, Romero I, Berruguilla E, Stefansky J, Collado A, Algarra I, Garrido F, Garcia-Lora AM (2012) MHC class I molecules act as tumor suppressor genes regulating the cell cycle gene expression, invasion and intrinsic tumorigenicity of melanoma cells. *Carcinogenesis* **33**(3): 687-693

Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006) Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* **6**(5): 383-393

Geginat J, Paroni M, Facciotti F, Gruarin P, Kastirr I, Caprioli F, Pagani M, Abrignani S (2013) The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Semin Immunol* **25**(4): 252-262

Gettinger S, Herbst RS (2014) B7-H1/PD-1 blockade therapy in non-small cell lung cancer: current status and future direction. *Cancer J* **20**(4): 281-289

Glouchkova L, Ackermann B, Zibert A, Meisel R, Siepermann M, Janka-Schaub GE, Goebel U, Troeger A, Dilloo D (2009) The CD70/CD27 pathway is critical for stimulation of an effective cytotoxic T cell response against B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol* **182**(1): 718-725

Goicoechea SM, Awadia S, Garcia-Mata R (2014) I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adh Migr* **8**(6): 535-549

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**(7130): 851-857

Green DR, Droin N, Pinkoski M (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* **193**: 70-81

Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**(7132): 153-158

Grewal IS (2008) CD70 as a therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets* **12**(3): 341-351

Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270**(5239): 1189-1192

Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T (1999) Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6879-6884

Guermonez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **20**: 621-667

Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM, Raulat DH (2008) NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* **28**(4): 571-580

- Guo R, Wang X, Chen J, Gillies E, Fung KM, Li S, Hassell LA (2014) Comparative genomic hybridization in a case of melanoma that loses expression of S100, HMB45, Melan A and tyrosinase in metastasis. *Int J Clin Exp Pathol* **7**(1): 468-473
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**(5291): 1363-1366
- Han W, Shi X, Nuttall AL (2006) AIF and endoG translocation in noise exposure induced hair cell death. *Hear Res* **211**(1-2): 85-95
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674
- Hao Z, Mak TW (2010) Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP. *J Mol Cell Biol* **2**(2): 63-64
- Harousseau JL, Martinelli G, Jedrzejczak WW, Brandwein JM, Bordessoule D, Masszi T, Ossenkuppele GJ, Alexeeva JA, Beutel G, Maertens J, Vidriales MB, Dombret H, Thomas X, Burnett AK, Robak T, Khuageva NK, Golenkov AK, Tothova E, Mollgard L, Park YC, Bessems A, De Porre P, Howes AJ (2009) A randomized phase 3 study of tipifarnib compared with best supportive care, including hydroxyurea, in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in patients 70 years or older. *Blood* **114**(6): 1166-1173
- Hart IR (1979) The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *Am J Pathol* **97**(3): 587-600
- Heasman SJ, Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 690-701
- Hertzman Johansson C, Egyhazi Brage S (2014) BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* **142**(2): 176-182
- Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y (2010) Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* **116**(7): 1757-1766
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urbaniak WJ (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**(8): 711-723
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arola ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stenke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**(2): 251-263
- Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR (2006) Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* **118**(3): 684-687
- Horng T, Bezradica JS, Medzhitov R (2007) NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol* **8**(12): 1345-1352
- Huvneers S, Danen EH (2009) Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**(Pt 8): 1059-1069
- Igney FH, Behrens CK, Krammer PH (2005) CD95L mediates tumor counterattack in vitro but induces neutrophil-independent tumor rejection in vivo. *Int J Cancer* **113**(1): 78-87
- Igney FH, Krammer PH (2005) Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother* **54**(11): 1127-1136
- Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2): 95-109
- Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S (1999) An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* **5**(2): 221-225
- Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z (2003) Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* **22**(20): 3152-3161
- Jackson B, Peyrollier K, Pedersen E, Basse A, Karlsson R, Wang Z, Lefever T, Ochsenbein AM, Schmidt G, Aktories K, Stanley A, Quondamatteo F, Ladwein M, Rottner K, van Hengel J, Brakebusch C (2011) RhoA is dispensable for skin development, but crucial for contraction and directed migration of keratinocytes. *Mol Biol Cell* **22**(5): 593-605
- Jacobs JF, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJ, Adema GJ (2012) Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol* **13**(1): e32-42
- Jang S, Atkins MB (2014) Treatment of BRAF-mutant melanoma: the role of vemurafenib and other therapies. *Clin Pharmacol Ther* **95**(1): 24-31



- Jantzen H, Dupre-Goetghebeur D, Spindler P, Merrer J (2009) [Sorafenib-induced multiple eruptive keratoacanthomas]. *Ann Dermatol Venereol* **136**(12): 894-897
- Jeffrey SC, Andreyka JB, Bernhardt SX, Kissler KM, Kline T, Lenox JS, Moser RF, Nguyen MT, Okeley NM, Stone IJ, Zhang X, Senter PD (2006) Development and properties of beta-glucuronide linkers for monoclonal antibody-drug conjugates. *Bioconjug Chem* **17**(3): 831-840
- Jensen P, Hansen S, Moller B, Leivestad T, Pfeffer P, Geiran O, Fauchald P, Simonsen S (1999) Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol* **40**(2 Pt 1): 177-186
- Jilaveanu LB, Sznol J, Aziz SA, Duchon D, Kluger HM, Camp RL (2012) CD70 expression patterns in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* **43**(9): 1394-1399
- Jodo S, Pidiyar VJ, Xiao S, Furusaki A, Sharma R, Koike T, Ju ST (2005) Fas ligand (CD178) cytoplasmic tail is a positive regulator of Fas ligand-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **174**(8): 4470-4474
- Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S (2012) Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **12**(8): 557-569
- Julian L, Olson MF (2015) Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases* **5**(2): e29846
- Junttila MR, de Sauvage FJ (2013) Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* **501**(7467): 346-354
- Juretic A, Spagnoli GC, Schultz-Thater E, Sarcevic B (2003) Cancer/testis tumour-associated antigens: immunohistochemical detection with monoclonal antibodies. *Lancet Oncol* **4**(2): 104-109
- Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S (2014) Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet* **46**(6): 583-587
- Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H (2009) Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res* **19**(5): 275-282
- Kamai T, Arai K, Sumi S, Tsujii T, Honda M, Yamanishi T, Yoshida KI (2002) The rho/rho-kinase pathway is involved in the progression of testicular germ cell tumour. *BJU Int* **89**(4): 449-453
- Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H (2003) Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res* **9**(7): 2632-2641
- Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, Yoshida K (2004) Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin Cancer Res* **10**(14): 4799-4805
- Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C (2009) Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1796**(2): 91-98
- Kazi A, Carie A, Blaskovich MA, Bucher C, Thai V, Moulder S, Peng H, Carrico D, Pusateri E, Pledger WJ, Berndt N, Hamilton A, Sefti SM (2009) Blockade of protein geranylgeranylation inhibits Cdk2-dependent p27Kip1 phosphorylation on Thr187 and accumulates p27Kip1 in the nucleus: implications for breast cancer therapy. *Mol Cell Biol* **29**(8): 2254-2263
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* **26**: 677-704
- Khammari A, Knol AC, Nguyen JM, Bossard C, Denis MG, Pandolfino MC, Quereux G, Bercegeay S, Dreno B (2014) Adoptive TIL transfer in the adjuvant setting for melanoma: long-term patient survival. *J Immunol Res* **2014**: 186212
- Khammari A, Nguyen JM, Pandolfino MC, Quereux G, Brocard A, Bercegeay S, Cassidanius A, Lemarre P, Volteau C, Labarriere N, Jotereau F, Dreno B (2007) Long-term follow-up of patients treated by adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* **56**(11): 1853-1860
- Khong HT, Wang QJ, Rosenberg SA (2004) Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J Immunother* **27**(3): 184-190
- Kim HS, Lee JW, Soung YH, Park WS, Kim SY, Lee JH, Park JY, Cho YG, Kim CJ, Jeong SW, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2003) Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* **125**(3): 708-715
- Kim T, Amaria RN, Spencer C, Reuben A, Cooper ZA, Wargo JA (2014) Combining targeted therapy and immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic melanoma. *Cancer Biol Med* **11**(4): 237-246
- Kirkwood JM, Bastholt L, Robert C, Sosman J, Larkin J, Hersey P, Middleton M, Cantarini M, Zazulina V, Kemsley K, Dummer R (2011) Phase II, open-label, randomized trial of the MEK1/2 inhibitor

selumetinib as monotherapy versus temozolomide in patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* **18**(2): 555-567

Kleber S, Sancho-Martinez I, Wiestler B, Beisel A, Gieffers C, Hill O, Thiemann M, Mueller W, Sykora J, Kuhn A, Schreglmann N, Letellier E, Zuliani C, Klussmann S, Teodorczyk M, Grone HJ, Ganten TM, Sultmann H, Tutenberg J, von Deimling A, Regnier-Vigouroux A, Herold-Mende C, Martin-Villalba A (2008) Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* **13**(3): 235-248

Kober J, Leitner J, Klausner C, Woitek R, Majdic O, Stockl J, Herndler-Brandstetter D, Grubeck-Loebenstien B, Reipert BM, Pickl WF, Pfistershammer K, Steinberger P (2008) The capacity of the TNF family members 4-1BBL, OX40L, CD70, GITRL, CD30L and LIGHT to costimulate human T cells. *Eur J Immunol* **38**(10): 2678-2688

Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**(7171): 903-907

Kosla J, Pankova D, Plachy J, Tolde O, Bicanova K, Dvorak M, Rosel D, Brabek J (2013) Metastasis of aggressive amoeboid sarcoma cells is dependent on Rho/ROCK/MLC signaling. *Cell Commun Signal* **11**: 51

Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchicocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, Choi M, Ariyan S, Narayan D, Dutton-Regester K, Capatana A, Holman EC, Bosenberg M, Sznol M, Kluger HM, Brash DE, Stern DF, Materin MA, Lo RS, Mane S, Ma S, Kidd KK, Hayward NK, Lifton RP, Schlessinger J, Boggon TJ, Halaban R (2012) Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* **44**(9): 1006-1014

Kugel CH, 3rd, Aplin AE (2014) Adaptive resistance to RAF inhibitors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*

Kusama T, Mukai M, Tatsuta M, Matsumoto Y, Nakamura H, Inoue M (2003) Selective inhibition of cancer cell invasion by a geranylgeranyltransferase-I inhibitor. *Clin Exp Metastasis* **20**(6): 561-567

Kykalos S, Mathaiou S, Karayiannakis AJ, Patsouras D, Lambropoulou M, Simopoulos C (2012) Tissue expression of the proteins fas and fas ligand in colorectal cancer and liver metastases. *J Gastrointest Cancer* **43**(2): 224-228

LA OR, Tai L, Lee L, Kruse EA, Grabow S, Fairlie WD, Haynes NM, Tarlinton DM, Zhang JG, Belz GT, Smyth MJ, Bouillet P, Robb L, Strasser A (2009) Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* **461**(7264): 659-663

Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F (2011) Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* **60**(7): 909-918

Lammermann T, Sixt M (2009) Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **21**(5): 636-644

Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG (2008) The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *Int J Oncol* **33**(3): 585-593

Lanier LL (2008) Up on the tighrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* **9**(5): 495-502

Lanoy E, Spano JP, Bonnet F, Guiguet M, Boue F, Cadranet J, Carcelain G, Couderc LJ, Frange P, Girard PM, Oksenhendler E, Poizot-Martin I, Semaille C, Agut H, Katlama C, Costagliola D (2011) The spectrum of malignancies in HIV-infected patients in 2006 in France: the ONCOVIH study. *Int J Cancer* **129**(2): 467-475

Lazer G, Katzav S (2011) Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy? *Cell Signal* **23**(6): 969-979

LeBlanc HN, Ashkenazi A (2003) Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* **10**(1): 66-75

Lengagne R, Pommier A, Caron J, Douguet L, Garcette M, Kato M, Avril MF, Abastado JP, Bercovici N, Lucas B, Prevost-Blondel A (2011) T cells contribute to tumor progression by favoring pro-tumoral properties of intra-tumoral myeloid cells in a mouse model for spontaneous melanoma. *PLoS One* **6**(5): e20235

Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V (2013) MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* **105**(16): 1172-1187

Lettau M, Paulsen M, Schmidt H, Janssen O (2010) Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology. *Eur J Cell Biol* **90**(6-7): 456-466

Li H, Fan X, Stoicov C, Liu JH, Zubair S, Tsai E, Ste Marie R, Wang TC, Lyle S, Kurt-Jones E, Houghton J (2009) Human and mouse colon cancer utilizes CD95 signaling for local growth and metastatic spread to liver. *Gastroenterology* **137**(3): 934-944, 944 e931-934

Lidsky M, Antoun G, Speicher P, Adams B, Turley R, Augustine C, Tyler D, Ali-Osman F (2014) MAP kinase hyper-activation and enhanced NRAS expression drive acquired vemurafenib resistance in V600E BRAF melanoma cells. *J Biol Chem*

- Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY (2008) Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA* **14**(3): 417-424
- Linard B, Bezieau S, Benlalam H, Labarriere N, Guilloux Y, Diez E, Jotereau F (2002) A ras-mutated peptide targeted by CTL infiltrating a human melanoma lesion. *J Immunol* **168**(9): 4802-4808
- Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB (1989) Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* **244**(4902): 339-343
- Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA (1991) Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* **173**(3): 721-730
- Liu M, Bi F, Zhou X, Zheng Y (2012) Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol* **22**(7): 365-373
- Liu N, Sheng X, Liu Y, Zhang X, Yu J (2013) Increased CD70 expression is associated with clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy and poor survival in advanced ovarian carcinomas. *Onco Targets Ther* **6**: 615-619
- Liu X, Choy E, Hornicek FJ, Yang S, Yang C, Harmon D, Mankin H, Duan Z (2011) ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma. *J Orthop Res* **29**(8): 1259-1266
- Lochhead PA, Wickman G, Mezna M, Olson MF (2010) Activating ROCK1 somatic mutations in human cancer. *Oncogene* **29**(17): 2591-2598
- Lou Z, Billadeau DD, Savoy DN, Schoon RA, Leibson PJ (2001) A role for a RhoA/ROCK/LIM-kinase pathway in the regulation of cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* **167**(10): 5749-5757
- Lu J, Chan L, Fiji HD, Dahl R, Kwon O, Tamanoi F (2009) In vivo antitumor effect of a novel inhibitor of protein geranylgeranyltransferase-I. *Mol Cancer Ther* **8**(5): 1218-1226
- Lytras T, Nikolopoulos G, Bonovas S (2014) Statins and the risk of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis of 40 studies. *World J Gastroenterol* **20**(7): 1858-1870
- Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J (2014) Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. *Arch Dermatol Res* **306**(6): 511-519
- Marquez-Medina D, Salla-Fortuny J, Salud-Salvia A (2012) Role of gamma-delta T-cells in cancer: another opening door to immunotherapy. *Clin Transl Oncol* **14**(12): 891-895
- Martin SS, Abd TT, Jones SR, Michos ED, Blumenthal RS, Blaha MJ (2014) 2013 ACC/AHA cholesterol treatment guideline: what was done well and what could be done better. *J Am Coll Cardiol* **63**(24): 2674-2678
- Matchett KB, McFarlane S, Hamilton SE, Eltuhamy YS, Davidson MA, Murray JT, Faheem AM, El-Tanani M (2014) Ran GTPase in nuclear envelope formation and cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* **773**: 323-351
- Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* **15**(9): 2208-2216
- Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, Pradines A, Sebti S, Favre G (2004) Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res* **10**(8): 2742-2750
- Mazieres J, Tovar D, He B, Nieto-Acosta J, Marty-Detraves C, Clanet C, Pradines A, Jablons D, Favre G (2007) Epigenetic regulation of RhoB loss of expression in lung cancer. *BMC Cancer* **7**: 220
- McEarchern JA, Oflazoglu E, Francisco L, McDonagh CF, Gordon KA, Stone I, Klussman K, Turcott E, van Rooijen N, Carter P, Grewal IS, Wahl AF, Law CL (2007) Engineered anti-CD70 antibody with multiple effector functions exhibits in vitro and in vivo antitumor activities. *Blood* **109**(3): 1185-1192
- McEarchern JA, Smith LM, McDonagh CF, Klussman K, Gordon KA, Morris-Tilden CA, Duniho S, Ryan M, Boursalian TE, Carter PJ, Grewal IS, Law CL (2008) Preclinical characterization of SGN-70, a humanized antibody directed against CD70. *Clin Cancer Res* **14**(23): 7763-7772
- McGlynn KA, Divine GW, Sahasrabudhe VV, Engel LS, VanSlooten A, Wells K, Yood MU, Alford SH (2014) Statin use and risk of hepatocellular carcinoma in a U.S. population. *Cancer Epidemiol* **38**(5): 523-527
- Mehlen P, Puisieux A (2006) Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* **6**(6): 449-458
- Melvin JC, Garmo H, Daniel R, Shanmugalingam T, Stattin P, Haggstrom C, Rudman S, Holmberg L, Van Hemelrijck M (2014) An investigation into the relationship between Statins and Cancer using population-based data. *BJU Int*
- Mesquita Junior D, Araujo JA, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel Wde M, Andrade LE, Silva NP (2010) Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev Bras Reumatol* **50**(5): 552-580

- Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I (2001) Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* **61**(2): 577-581
- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* **27**: 16-25
- Moon H, Hill MM, Roberts MJ, Gardiner RA, Brown AJ (2014) Statins: protectors or pretenders in prostate cancer? *Trends Endocrinol Metab* **25**(4): 188-196
- Moon SY, Zheng Y (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**(1): 13-22
- Moores SL, Schaber MD, Mosser SD, Rands E, O'Hara MB, Garsky VM, Marshall MS, Pompliano DL, Gibbs JB (1991) Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol Chem* **266**(22): 14603-14610
- Morgan-Fisher M, Wewer UM, Yoneda A (2013) Regulation of ROCK activity in cancer. *J Histochem Cytochem* **61**(3): 185-198
- Moro N, Mauch C, Zigrino P (2014) Metalloproteinases in melanoma. *Eur J Cell Biol* **93**(1-2): 23-29
- Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, Lal P, Feldman MD, Benencia F, Coukos G (2014) Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med* **20**(6): 607-615
- Mouawad R, Sebert M, Michels J, Bloch J, Spano JP, Khayat D (2010) Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit Rev Oncol Hematol* **74**(1): 27-39
- Mueller BK, Mack H, Teusch N (2005) Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* **4**(5): 387-398
- Mule JJ, Ettinghausen SE, Spiess PJ, Shu S, Rosenberg SA (1986) Antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo: survival benefit and mechanisms of tumor escape in mice undergoing immunotherapy. *Cancer Res* **46**(2): 676-683
- Mullbacher A, Lobigs M, Hla RT, Tran T, Stehle T, Simon MM (2002) Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis. *J Immunol* **169**(1): 145-150
- Mullin M, Lightfoot K, Clarke R, Miller M, Lahesmaa R, Cantrell D (2007) The RhoA transcriptional program in pre-T cells. *FEBS Lett* **581**(22): 4309-4317
- Munz C, Steinman RM, Fujii S (2005) Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* **202**(2): 203-207
- Murphy AC, Weyhenmeyer B, Noonan J, Kilbride SM, Schimansky S, Loh KP, Kogel D, Letai AG, Prehn JH, Murphy BM (2014) Modulation of Mcl-1 sensitizes glioblastoma to TRAIL-induced apoptosis. *Apoptosis* **19**(4): 629-642
- Nagata S, Suda T (1995) Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* **16**(1): 39-43
- Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S (1996) ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* **392**(2): 189-193
- Nakajima M, Hayashi K, Egi Y, Katayama K, Amano Y, Uehata M, Ohtsuki M, Fujii A, Oshita K, Kataoka H, Chiba K, Goto N, Kondo T (2003a) Effect of Wf-536, a novel ROCK inhibitor, against metastasis of B16 melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **52**(4): 319-324
- Nakajima M, Hayashi K, Katayama K, Amano Y, Egi Y, Uehata M, Goto N, Kondo T (2003b) Wf-536 prevents tumor metastasis by inhibiting both tumor motility and angiogenic actions. *Eur J Pharmacol* **459**(2-3): 113-120
- Nakajima M, Katayama K, Tamechika I, Hayashi K, Amano Y, Uehata M, Goto N, Kondo T (2003c) WF-536 inhibits metastatic invasion by enhancing the host cell barrier and inhibiting tumour cell motility. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**(7): 457-463
- Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T (2009) Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **28**(1-2): 65-76
- Nausch N, Cerwenka A (2008) NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* **27**(45): 5944-5958
- Neagu M, Constantin C, Zurac S (2013) Immune parameters in the prognosis and therapy monitoring of cutaneous melanoma patients: experience, role, and limitations. *Biomed Res Int* **2013**: 107940
- Nicolson GL, Brunson KW, Fidler IJ (1978) Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Res* **38**(11 Pt 2): 4105-4111
- Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, Tsao H (2012) Melanoma: new insights and new therapies. *J Invest Dermatol* **132**(3 Pt 2): 854-863
- Nishikawa H, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* **127**(4): 759-767

- Nishimura Y, Itoh K, Yoshioka K, Tokuda K, Himeno M (2003) Overexpression of ROCK in human breast cancer cells: evidence that ROCK activity mediates intracellular membrane traffic of lysosomes. *Pathol Oncol Res* **9**(2): 83-95
- Nolte MA, van Oeffen RW, van Gisbergen KP, van Lier RA (2009) Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunol Rev* **229**(1): 216-231
- Noy R, Pollard JW (2014) Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**(1): 49-61
- Nunez S, Saez JJ, Fernandez D, Flores-Santibanez F, Alvarez K, Tejon G, Ruiz P, Maldonado P, Hidalgo Y, Manriquez V, Bono MR, Rosemblatt M, Sauma D (2012) T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology* **139**(1): 61-71
- Nurieva RI, Chung Y (2010) Understanding the development and function of T follicular helper cells. *Cell Mol Immunol* **7**(3): 190-197
- Nurieva RI, Liu X, Dong C (2009) Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol Rev* **229**(1): 88-100
- O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N (2004) Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* **104**(8): 2235-2246
- Ogata S, Morishige K, Sawada K, Hashimoto K, Mabuchi S, Kawase C, Ooyagi C, Sakata M, Kimura T (2009) Fasudil inhibits lysophosphatidic acid-induced invasiveness of human ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* **19**(9): 1473-1480
- Ohkura N, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* **32**(2): 95-106
- Olive D, le Thi S, Xerri L, Hirsch I, Nunes JA (2011) [The role of co-inhibitory signals driven by CTLA-4 in immune system]. *Med Sci (Paris)* **27**(10): 842-849
- Olson MF (2008) Applications for ROCK kinase inhibition. *Curr Opin Cell Biol* **20**(2): 242-248
- Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE, Girardi M, Hayday AC (2005) Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* **6**(9): 928-937
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* **182**(8): 4499-4506
- Ota T, Maeda M, Okamoto M, Tatsuka M (2015) Positive regulation of Rho GTPase activity by RhoGDIs as a result of their direct interaction with GAPs. *BMC Syst Biol* **9**: 3
- Owen SA, Sanders LL, Edwards LJ, Seigler HF, Tyler DS, Grichnik JM (2001) Identification of higher risk thin melanomas should be based on Breslow depth not Clark level IV. *Cancer* **91**(5): 983-991
- Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* **353**(25): 2654-2666
- Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**(4): 252-264
- Parmiani G, Maccalli C (2012) The early antitumor immune response is necessary for tumor growth: Re-visiting Prehn's hypothesis in the human melanoma system. *Oncimmunology* **1**(6): 930-934
- Paschen A, Sucker A, Hill B, Moll I, Zapatka M, Nguyen XD, Sim GC, Gutmann I, Hassel J, Becker JC, Steinle A, Schadendorf D, Ugurel S (2009) Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin Cancer Res* **15**(16): 5208-5215
- Patel RA, Forinash KD, Pireddu R, Sun Y, Sun N, Martin MP, Schonbrunn E, Lawrence NJ, Sefti SM (2012) RKI-1447 is a potent inhibitor of the Rho-associated ROCK kinases with anti-invasive and antitumor activities in breast cancer. *Cancer Res* **72**(19): 5025-5034
- Paulitschke V, Gruber S, Hofstatter E, Haudek-Prinz V, Klepeisz P, Schicher N, Jonak C, Petzelbauer P, Pehamberger H, Gerner C, Kunstfeld R (2012) Proteome analysis identified the PPARgamma ligand 15d-PGJ2 as a novel drug inhibiting melanoma progression and interfering with tumor-stroma interaction. *PLoS One* **7**(9): e46103
- Paulsen M, Valentin S, Mathew B, Adam-Klages S, Bertsch U, Lavrik I, Krammer PH, Kabelitz D, Janssen O (2011) Modulation of CD4+ T-cell activation by CD95 co-stimulation. *Cell Death Differ* **18**(4): 619-631
- Pedersen E, Brakebusch C (2012) Rho GTPase function in development: how in vivo models change our view. *Exp Cell Res* **318**(14): 1779-1787
- Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A (2002) Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding

protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* **62**(21): 6178-6186

Peter ME, Krammer PH (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**(1): 26-35

Petrau C, Cornic M, Bertrand P, Maingonnat C, Marchand V, Picquenot JM, Jardin F, Clatot F (2014) CD70: A Potential Target in Breast Cancer? *J Cancer* **5**(9): 761-764

Phan GQ, Weber JS, Sondak VK (2008) CTLA-4 blockade with monoclonal antibodies in patients with metastatic cancer: surgical issues. *Ann Surg Oncol* **15**(11): 3014-3021

Pinner S, Sahai E (2008) Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo. *J Microsc* **231**(3): 441-445

Polak ME, Newell L, Taraban VY, Pickard C, Healy E, Friedman PS, Al-Shamkhani A, Ardern-Jones MR (2012) CD70-CD27 interaction augments CD8+ T-cell activation by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* **132**(6): 1636-1644

Pope RM (2002) Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* **2**(7): 527-535

Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, Shi H, Atefi M, Titz B, Gabay MT, Salton M, Dahlman KB, Tadi M, Wargo JA, Flaherty KT, Kelley MC, Misteli T, Chapman PB, Sosman JA, Graeber TG, Ribas A, Lo RS, Rosen N, Solit DB (2011) RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* **480**(7377): 387-390

Prasad KV, Ao Z, Yoon Y, Wu MX, Rizk M, Jacquot S, Schlossman SF (1997) CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12): 6346-6351

Prasad S, Kim JH, Gupta SC, Aggarwal BB (2014) Targeting death receptors for TRAIL by agents designed by Mother Nature. *Trends Pharmacol Sci*

Prendergast GC (2013) Immunological thought in the mainstream of cancer research: Past divorce, recent remarriage and elective affinities of the future. *Oncoimmunology* **1**(6): 793-797

Preudhomme C, Roumier C, Hildebrand MP, Dallery-Prudhomme E, Lantoine D, Lai JL, Daudignon A, Adenis C, Bauters F, Fenaux P, Kerckaert JP, Galieue-Zouitina S (2000) Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene* **19**(16): 2023-2032

Rabenstein H, Behrendt AC, Ellwart JW, Naumann R, Horsch M, Beckers J, Obst R (2014) Differential kinetics of antigen dependency of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **192**(8): 3507-3517

Radisky ES, Radisky DC (2010) Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**(2): 201-212

Radoja S, Rao TD, Hillman D, Frey AB (2000) Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **164**(5): 2619-2628

Rao S, Cunningham D, de Gramont A, Scheithauer W, Smakal M, Humblet Y, Kourteva G, Iveson T, Andre T, Dostalova J, Illes A, Belly R, Perez-Ruixo JJ, Park YC, Palmer PA (2004) Phase III double-blind placebo-controlled study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* **22**(19): 3950-3957

Rath N, Olson MF (2011) Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. *EMBO Rep* **13**(10): 900-908

Reis e Sousa C (2006) Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* **6**(6): 476-483

Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G (2001) A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* **50**(1): 3-15

Ribas A, Kefford R, Marshall MA, Punt CJ, Haanen JB, Marmol M, Garbe C, Gogas H, Schachter J, Linette G, Lorigan P, Kendra KL, Maio M, Trefzer U, Smylie M, McArthur GA, Dreno B, Nathan PD, Mackiewicz J, Kirkwood JM, Gomez-Navarro J, Huang B, Pavlov D, Hauschild A (2013) Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* **31**(5): 616-622

Richards H, Williams A, Jones E, Hindley J, Godkin A, Simon AK, Gallimore A (2010) Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology* **131**(4): 583-592

Riddick N, Ohtani K, Surks HK (2008) Targeting by myosin phosphatase-RhoA interacting protein mediates RhoA/ROCK regulation of myosin phosphatase. *J Cell Biochem* **103**(4): 1158-1170

Ridley AJ (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* **16**(10): 522-529

Ridolfi L, Petrini M, Fiammenghi L, Granato AM, Ancarani V, Pancisi E, Brolli C, Selva M, Scarpi E, Valmorri L, Nicoletti SV, Guidoboni M, Riccobon A, Ridolfi R (2011) Dendritic cell-based vaccine in advanced melanoma: update of clinical outcome. *Melanoma Res* **21**(6): 524-529

Riedl SJ, Salvesen GS (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 405-413

- Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ (2003) RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* **23**(12): 4219-4229
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Fischer A (2003) Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ* **10**(1): 124-133
- Robert C, Dummer R, Gutzmer R, Lorigan P, Kim KB, Nyakas M, Arance A, Liskay G, Schadendorf D, Cantarini M, Spencer S, Middleton MR (2013) Selumetinib plus dacarbazine versus placebo plus dacarbazine as first-line treatment for BRAF-mutant metastatic melanoma: a phase 2 double-blind randomised study. *Lancet Oncol* **14**(8): 733-740
- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M DJ, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH, Jr., Gascon P, Lotem M, Harmankaya K, Ibrahim R, Francis S, Chen TT, Humphrey R, Hoos A, Wolchok JD (2011) Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* **364**(26): 2517-2526
- Roberts DJ, Franklin NA, Kingeter LM, Yagita H, Tutt AL, Glennie MJ, Bullock TN (2010) Control of established melanoma by CD27 stimulation is associated with enhanced effector function and persistence, and reduced PD-1 expression of tumor infiltrating CD8(+) T cells. *J Immunother* **33**(8): 769-779
- Roberts PJ, Mitin N, Keller PJ, Chenette EJ, Madigan JP, Currin RO, Cox AD, Wilson O, Kirschmeier P, Der CJ (2008) Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled postranslational modification. *J Biol Chem* **283**(37): 25150-25163
- Rogers HW, Weinstock MA, Harris AR, Hinckley MR, Feldman SR, Fleischer AB, Coldiron BM (2010) Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Arch Dermatol* **146**(3): 283-287
- Romieu-Mourez R, Solis M, Nardin A, Goubau D, Baron-Bodo V, Lin R, Massie B, Salcedo M, Hiscott J (2006) Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages. *Cancer Res* **66**(21): 10576-10585
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, et al. (1990) Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* **323**(9): 570-578
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME (2008) Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **8**(4): 299-308
- Routhier A, Astuccio M, Lahey D, Monfredo N, Johnson A, Callahan W, Partington A, Fellows K, Ouellette L, Zhidro S, Goodrow C, Smith A, Sullivan K, Simone P, Le L, Vezuli B, Zohni M, West E, Gleason D, Bryan B (2010) Pharmacological inhibition of Rho-kinase signaling with Y-27632 blocks melanoma tumor growth. *Oncol Rep* **23**(3): 861-867
- Rudd CE (2008) The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nat Rev Immunol* **8**(2): 153-160
- Ryan AE, Shanahan F, O'Connell J, Houston AM (2006) Fas ligand promotes tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cell Cycle* **5**(3): 246-249
- Sahai E (2007) Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* **7**(10): 737-749
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ (2008) Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* **135**(3): 510-523
- Sapkota B, Hill CE, Pollack BP (2013) Vemurafenib enhances MHC induction in BRAF homozygous melanoma cells. *Oncoimmunology* **2**(1): e22890
- Sarrabayrouse G, Pich C, Moriez R, Armand-Labit V, Rochemaix P, Favre G, Tilkin-Mariame AF (2010) Melanoma cells treated with GGTI and IFN-gamma allow murine vaccination and enhance cytotoxic response against human melanoma cells. *PLoS One* **5**(2): e9043
- Sarrabayrouse G, Synaeve C, Leveque K, Favre G, Tilkin-Mariame AF (2007) Statins stimulate in vitro membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells. *Neoplasia* **9**(12): 1078-1090
- Schilling B, Sondermann W, Zhao F, Griewank KG, Livingstone E, Sucker A, Zelba H, Weide B, Trefzer U, Wilhelm T, Loquai C, Berking C, Hassel J, Kahler KC, Utikal J, Al Ghazal P, Gutzmer R, Goldinger SM, Zimmer L, Paschen A, Hillen U, Schadendorf D (2014) Differential influence of vemurafenib and dabrafenib on patients' lymphocytes despite similar clinical efficacy in melanoma. *Ann Oncol* **25**(3): 747-753
- Schmid MC, Varner JA (2010) Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J Oncol* **2010**: 201026
- Schofield AV, Bernard O (2013) Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**(4): 301-316
- Schofield AV, Gamell C, Suryadinata R, Sarcevic B, Bernard O (2013) Tubulin polymerization promoting protein 1 (Tppp1) phosphorylation by Rho-associated coiled-coil kinase (rock) and cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) inhibits microtubule dynamics to increase cell proliferation. *J Biol Chem* **288**(11): 7907-7917
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**(6024): 1565-1570

- Schulte M, Reiss K, Lettau M, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, de Strooper B, Janssen O, Saftig P (2007) ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ* **14**(5): 1040-1049
- Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, Kendra KL, White RL, Gonzalez R, Kuzel TM, Curti B, Leming PD, Whitman ED, Balkissoon J, Reintgen DS, Kaufman H, Marincola FM, Merino MJ, Rosenberg SA, Choyke P, Vena D, Hwu P (2011) gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* **364**(22): 2119-2127
- Schwinn N, Vokhminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I, Nausch N, Tuettenberg J, Steinle A, Cerwenka A, Schadendorf D, Paschen A (2009) Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytolysis of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer* **124**(7): 1594-1604
- Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Breard J (2005) Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med* **201**(3): 465-471
- Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* **3**(4): 346-352
- Seino K, Kayagaki N, Okumura K, Yagita H (1997) Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat Med* **3**(2): 165-170
- Seliger B (2014) B7-H abnormalities in melanoma and clinical relevance. *Methods Mol Biol* **1102**: 367-380
- Shah S, Wu E, Rao VK, Tarrant TK (2014) Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an update and review of the literature. *Curr Allergy Asthma Rep* **14**(9): 462
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001) IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**(6832): 1107-1111
- Sharkey MS, Lizee G, Gonzales MI, Patel S, Topalian SL (2004) CD4(+) T-cell recognition of mutated B-RAF in melanoma patients harboring the V599E mutation. *Cancer Res* **64**(5): 1595-1599
- Shi J, Wu X, Surma M, Vemula S, Zhang L, Yang Y, Kapur R, Wei L (2013) Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment. *Cell Death Dis* **4**: e483
- Shi M, Zheng H, Nie B, Gong W, Cui X (2014a) Statin use and risk of liver cancer: an update meta-analysis. *BMJ Open* **4**(9): e005399
- Shi Y, Yu P, Zeng D, Qian F, Lei X, Zhao Y, Tang B, Hao Y, Luo H, Chen J, Tan Y (2014b) Suppression of vascular endothelial growth factor abrogates the immunosuppressive capability of murine gastric cancer cells and elicits antitumor immunity. *FEBS J* **281**(17): 3882-3893
- Shimoyama M, Kanda T, Liu L, Koyama Y, Suda T, Sakai Y, Hatakeyama K (2001) Expression of Fas ligand is an early event in colorectal carcinogenesis. *J Surg Oncol* **76**(1): 63-68; discussion 69
- Shinohara H, Yagita H, Ikawa Y, Oyaizu N (2000) Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res* **60**(6): 1766-1772
- Shultz LD, Brehm MA, Bavari S, Greiner DL (2011) Humanized mice as a preclinical tool for infectious disease and biomedical research. *Ann N Y Acad Sci* **1245**: 50-54
- Shurin GV, Tourkova IL, Chatta GS, Schmidt G, Wei S, Djeu JY, Shurin MR (2005) Small rho GTPases regulate antigen presentation in dendritic cells. *J Immunol* **174**(6): 3394-3400
- Silverberg MJ, Chao C, Leyden WA, Xu L, Horberg MA, Klein D, Towner WJ, Dubrow R, Quesenberry CP, Jr., Neugebauer RS, Abrams DI (2011) HIV infection, immunodeficiency, viral replication, and the risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**(12): 2551-2559
- Siri A, de Boysson H, Boursier G (2012) [Regulatory T lymphocytes CD4(+): current issues]. *Med Sci (Paris)* **28**(6-7): 646-651
- Smit MA, Maddalo G, Greig K, Raaijmakers LM, Possik PA, van Breukelen B, Cappadona S, Heck AJ, Altelaar AF, Peeper DS (2014) ROCK1 is a potential combinatorial drug target for BRAF mutant melanoma. *Mol Syst Biol* **10**: 772
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS (2009) T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**: 591-619
- Spagnolo F, Ghiorzo P, Orgiano L, Pastorino L, Picasso V, Tornari E, Ottaviano V, Queirolo P (2015) BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *Onco Targets Ther* **8**: 157-168
- Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL (2013) NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun* **13**: 8



- Staus DP, Weise-Cross L, Mangum KD, Medlin MD, Mangiante L, Taylor JM, Mack CP (2014) Nuclear RhoA signaling regulates MRTF-dependent SMC-specific transcription. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **307**(3): H379-390
- Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T (2001) Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* **53**(4): 279-287
- Stewart TJ, Abrams SI (2008) How tumours escape mass destruction. *Oncogene* **27**(45): 5894-5903
- Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ (2002) Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* **196**(1): 129-134
- Streilein JW (2003) Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *J Leukoc Biol* **74**(2): 179-185
- Stuckey DW, Shah K (2013) TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. *Trends Mol Med* **19**(11): 685-694
- Sucker A, Zhao F, Real B, Heeke C, Bielefeld N, Mabetan S, Horn S, Moll I, Maltaner R, Horn PA, Schilling B, Sabbatino F, Lennerz V, Kloor M, Ferrone S, Schadendorf D, Falk CS, Griewank K, Paschen A (2014) Genetic evolution of T-cell resistance in the course of melanoma progression. *Clin Cancer Res* **20**(24): 6593-6604
- Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, Haanen J, Blank C, Wesseling J, Willems SM, Zecchin D, Hobor S, Bajpe PK, Lieftink C, Mateus C, Vagner S, Grenrum W, Hofland I, Schlicker A, Wessels LF, Beijersbergen RL, Bardelli A, Di Nicolantonio F, Eggermont AM, Bernards R (2014a) Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* **508**(7494): 118-122
- Sun D, Wang X, Zhang H, Deng L, Zhang Y (2014b) MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int* **35**(6): 569-574
- Sun K, Duan X, Cai H, Liu X, Yang Y, Li M, Zhang X, Wang J (2015) Curcumin inhibits LPA-induced invasion by attenuating RhoA/ROCK/MMPs pathway in MCF7 breast cancer cells. *Clin Exp Med*
- Sun LX, Lin ZB, Duan XS, Qi HH, Yang N, Li M, Xing EH, Sun Y, Yu M, Li WD, Lu J (2014c) Suppression of the production of transforming growth factor beta1, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in the B16F10 cells by Ganoderma lucidum polysaccharides. *J Interferon Cytokine Res* **34**(9): 667-675
- Sun M, Ames KT, Suzuki I, Fink PJ (2006a) The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. *J Immunol* **177**(3): 1481-1491
- Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK, Wang X (2006b) B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **53**(2): 143-151
- Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, Sugiyama H, Seto M, Takakura K (2008) Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil-ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post-marketing surveillance study. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **48**(6): 241-247; discussion 247-248
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**(6): 655-669
- Tacken PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG (2007) Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* **7**(10): 790-802
- Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**(6): 969-976
- Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S (2001) Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology* **33**(3): 577-581
- Takesono A, Heasman SJ, Wojciak-Stothard B, Garg R, Ridley AJ (2010) Microtubules regulate migratory polarity through Rho/ROCK signaling in T cells. *PLoS One* **5**(1): e8774
- Tarhini AA, Cherian J, Moschos SJ, Tawbi HA, Shuai Y, Gooding WE, Sander C, Kirkwood JM (2012) Safety and efficacy of combination immunotherapy with interferon alfa-2b and tremelimumab in patients with stage IV melanoma. *J Clin Oncol* **30**(3): 322-328
- Tauzin S, Debure L, Moreau JF, Legembre P (2011) CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations. *Cell Mol Life Sci* **69**(8): 1261-1277
- Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS (2007) Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **25**(7): 869-875
- Tcherkezian J, Lamarche-Vane N (2007) Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* **99**(2): 67-86
- Terabe M, Berzofsky JA (2014) The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases. *Cancer Immunol Immunother* **63**(3): 199-213
- Tetlow AL, Tamanoi F (2013) The Ras superfamily G-proteins. *Enzymes* **33 Pt A**: 1-14
- Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF (2005) Cutaneous melanoma. *Lancet* **365**(9460): 687-701

- Thumkeo D, Watanabe S, Narumiya S (2013) Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur J Cell Biol* **92**(10-11): 303-315
- Tian F, Lu JJ, Wang L, Li L, Yang J, Li Y, Liu YQ, Shen GX, Tu YT, Tao J (2012) Expression of c-FLIP in malignant melanoma, and its relationship with the clinicopathological features of the disease. *Clin Exp Dermatol* **37**(3): 259-265
- Tilkin-Mariame AF, Cormary C, Ferro N, Sarrabayrouse G, Lajoie-Mazenc I, Faye JC, Favre G (2005) Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. *FASEB J* **19**(11): 1513-1515
- Tjin EP, Krebbers G, Meijlink KJ, van de Kastelee W, Rosenberg EH, Sanders J, Nederlof PM, van de Wiel BA, Haanen JB, Melief CJ, Vyth-Dreese FA, Luiten RM (2014) Immune-escape markers in relation to clinical outcome of advanced melanoma patients following immunotherapy. *Cancer Immunol Res* **2**(6): 538-546
- Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, Lawrence DP, Atkins MB, Powderly JD, Leming PD, Lipson EJ, Puzanov I, Smith DC, Taube JM, Wigginton JM, Kollia GD, Gupta A, Pardoll DM, Sosman JA, Hodi FS (2014) Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* **32**(10): 1020-1030
- Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol* **29**(36): 4828-4836
- Trapani JA, Smyth MJ (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* **2**(10): 735-747
- Traubold A, Roder C, Sipos B, Karsten K, Arlt A, Jiang P, Martin-Subero JI, Siegmund D, Muerkoster S, Pagerols-Raluy L, Siebert R, Wajant H, Kalthoff H (2005) CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *FASEB J* **19**(6): 620-622
- Tringler B, Zhuo S, Pilkington G, Torkko KC, Singh M, Lucia MS, Heinz DE, Papkoff J, Shroyer KR (2005) B7-h4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer. *Clin Cancer Res* **11**(5): 1842-1848
- Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass NK, Sproesser K, Li L, Smalley KS, Fong D, Zhu YL, Marimuthu A, Nguyen H, Lam B, Liu J, Cheung I, Rice J, Suzuki Y, Luu C, Settachatgul C, Shellooe R, Cantwell J, Kim SH, Schlessinger J, Zhang KY, West BL, Powell B, Habets G, Zhang C, Ibrahim PN, Hirth P, Artis DR, Herlyn M, Bollag G (2008) Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 3041-3046
- Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, Schoffski P, Post S, Verslype C, Neumann H, Safran H, Humblet Y, Perez Ruixo J, Ma Y, Von Hoff D (2004) Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **22**(8): 1430-1438
- Van den Eynde BJ, Boon T (1997) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res* **27**(2): 81-86
- Varney ML, Johansson SL, Singh RK (2005) Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: role of monocyte chemoattractant protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. *Melanoma Res* **15**(5): 417-425
- Vega FM, Ridley AJ (2008) Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* **582**(14): 2093-2101
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* **29**: 235-271
- Vetter CS, Groh V, Thor Straten P, Spies T, Brocker EB, Becker JC (2002) Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol* **118**(4): 600-605
- Vigneron N, Stroobant V, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P (2013) Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immun* **13**: 15
- Visvikis O, Maddugoda MP, Lemichez E (2010) Direct modifications of Rho proteins: deconstructing GTPase regulation. *Biol Cell* **102**(7): 377-389
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* **9**(5): 503-510
- Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* **12**(4): 239-252
- Wada A, Tada Y, Kawamura K, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Takenouchi T, J OW, Tagawa M (2007) The effects of FasL on inflammation and tumor survival are dependent on its expression levels. *Cancer Gene Ther* **14**(3): 262-267
- Walker EJ, Ko AH, Holly EA, Bracci PM (2015) Statin use and risk of pancreatic cancer: Results from a large, clinic-based case-control study. *Cancer*
- Walker LS (2013) Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun* **45**: 49-57
- Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E (2005) Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* **106**(7): 2252-2258

- Wang DS, Dou KF, Li KZ, Song ZS (2004) Enhancement of migration and invasion of hepatoma cells via a Rho GTPase signaling pathway. *World J Gastroenterol* **10**(2): 299-302
- Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, Siu HC, Deng S, Chu KM, Law S, Chan KH, Chan AS, Tsui WY, Ho SL, Chan AK, Man JL, Foglizzo V, Ng MK, Ching YP, Cheng GH, Xie T, Fernandez J, Li VS, Clevers H, Rejto PA, Mao M, Leung SY (2014) Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet* **46**(6): 573-582
- Wang S, Chen L (2004) T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol* **1**(1): 37-42
- Wasinger C, Kunzl M, Minichsdorfer C, Holler C, Zellner M, Hohenegger M (2014) Autocrine secretion of 15d-PGJ2 mediates simvastatin-induced apoptotic burst in human metastatic melanoma cells. *Br J Pharmacol* **171**(24): 5708-5727
- Watanabe D, Suda T, Hashimoto H, Nagata S (1995) Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. *EMBO J* **14**(1): 12-18
- Watts TH (2005) TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* **23**: 23-68
- Wei Y, Fan T, Yu M (2008) Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**(4): 278-288
- Weiss MB, Abel EV, Mayberry MM, Basile KJ, Berger AC, Aplin AE (2012) TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells. *Cancer Res* **72**(24): 6382-6392
- Wellbrock C, Hurlstone A (2010) BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol* **80**(5): 561-567
- Wellbrock C, Rana S, Paterson H, Pickersgill H, Brummelkamp T, Marais R (2008) Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One* **3**(7): e2734
- Wennerberg K, Der CJ (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**(Pt 8): 1301-1312
- Whipple CA, Brinckerhoff CE (2014) BRAF(V600E) melanoma cells secrete factors that activate stromal fibroblasts and enhance tumorigenicity. *Br J Cancer* **111**(8): 1625-1633
- Wilding JP (2012) PPAR agonists for the treatment of cardiovascular disease in patients with diabetes. *Diabetes Obes Metab* **14**(11): 973-982
- Wischhusen J, Jung G, Radovanovic I, Beier C, Steinbach JP, Rimmer A, Huang H, Schulz JB, Ohgaki H, Aguzzi A, Rammensee HG, Weller M (2002) Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma. *Cancer Res* **62**(9): 2592-2599
- Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, Agunwamba BU, Zhang X, Lowy I, Inzunza HD, Feely W, Horak CE, Hong Q, Korman AJ, Wigginton JM, Gupta A, Sznol M (2013) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* **369**(2): 122-133
- Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D (1995) A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269**(5228): 1281-1284
- Wong CC, Wong CM, Tung EK, Au SL, Lee JM, Poon RT, Man K, Ng IO (2011) The microRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating Rho-kinase 2. *Gastroenterology* **140**(1): 322-331
- Wong CC, Wong CM, Tung EK, Man K, Ng IO (2009) Rho-kinase 2 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma and involved in tumor invasion. *Hepatology* **49**(5): 1583-1594
- Wu X, Lippman SM (2011) An intermittent approach for cancer chemoprevention. *Nat Rev Cancer* **11**(12): 879-885
- Wu XD, Zeng K, Xue FQ, Chen JH, Chen YQ (2013) Statins are associated with reduced risk of gastric cancer: a meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* **69**(10): 1855-1860
- Xu XT, Song QB, Yao Y, Ruan P, Tao ZZ (2012) Inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway promotes the apoptosis of gastric cancer cells. *Hepatogastroenterology* **59**(120): 2523-2526
- Xu Y, Pektor S, Balkow S, Hemkemeyer SA, Liu Z, Grobe K, Hanley PJ, Shen L, Bros M, Schmidt T, Bahler M, Grabbe S (2014) Dendritic cell motility and T cell activation requires regulation of Rho-cofilin signaling by the Rho-GTPase activating protein myosin IXb. *J Immunol* **192**(8): 3559-3568
- Yadav D, Ngolab J, Lim RS, Krishnamurthy S, Bui JD (2009) Cutting edge: down-regulation of MHC class I-related chain A on tumor cells by IFN-gamma-induced microRNA. *J Immunol* **182**(1): 39-43
- Yamamoto H, Kishimoto T, Minamoto S (1998) NF-kappaB activation in CD27 signaling: involvement of TNF receptor-associated factors in its signaling and identification of functional region of CD27. *J Immunol* **161**(9): 4753-4759

- Yang FQ, Liu M, Yang FP, Zhang XL, Yang B, Guo CC, Huang JH, Che JP, Yan Y, Zheng JH (2014) Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) mediates MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) shedding in renal cell carcinoma. *Actas Urol Esp* **38**(3): 172-178
- Yang X, Di J, Zhang Y, Zhang S, Lu J, Liu J, Shi W (2012) The Rho-kinase inhibitor inhibits proliferation and metastasis of small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother* **66**(3): 221-227
- Yeganeh B, Wiechec E, Ande SR, Sharma P, Moghadam AR, Post M, Freed DH, Hashemi M, Shojaei S, Zeki AA, Ghavami S (2014) Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease. *Pharmacol Ther* **143**(1): 87-110
- Ying H, Biroc SL, Li WW, Alicke B, Xuan JA, Pagila R, Ohashi Y, Okada T, Kamata Y, Dinter H (2006) The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther* **5**(9): 2158-2164
- Yu SE, Park SH, Jang YK (2010) Epigenetic silencing of TNFSF7 (CD70) by DNA methylation during progression to breast cancer. *Mol Cells* **29**(2): 217-221
- Zafirova B, Wensveen FM, Gulin M, Polic B (2011) Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell Mol Life Sci* **68**(21): 3519-3529
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 107-117
- Zhang C, Niu J, Zhang J, Wang Y, Zhou Z, Tian Z (2008) Opposing effects of interferon-alpha and interferon-gamma on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors. *Cancer Sci* **99**(6): 1279-1286
- Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, Wei YQ (2012a) Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* **7**(12): e50946
- Zhang W, Huang Y, Wu Y, Gunst SJ (2015) A novel role for RhoA GTPase in the regulation of airway smooth muscle contraction. *Can J Physiol Pharmacol* **93**(2): 129-136
- Zhang Z, Ren JH, Li ZY, Nong L, Wu G (2012b) Fasudil inhibits lung carcinoma-conditioned endothelial cell viability and migration. *Oncol Rep* **27**(5): 1561-1566
- Zhao J, Zhou D, Guo J, Ren Z, Zhou L, Wang S, Xu B, Wang R (2006) Effect of fasudil hydrochloride, a protein kinase inhibitor, on cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemic symptoms after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **46**(9): 421-428
- Zheng F, Liao YJ, Cai MY, Liu YH, Liu TH, Chen SP, Bian XW, Guan XY, Lin MC, Zeng YX, Kung HF, Xie D (2012) The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2. *Gut* **61**(2): 278-289
- Zheng W, Flavell RA (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**(4): 587-596
- Zhou J, Yang J, Li K, Mo P, Feng B, Wang X, Nie Y, Fan D (2013) RhoE is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* **20**(1): 175-182
- Zhu Q, Liu JY, Xu HW, Yang CM, Zhang AZ, Cui Y, Wang HB (2005) Mechanism of counterattack of colorectal cancer cell by Fas/Fas ligand system. *World J Gastroenterol* **11**(39): 6125-6129
- Zimonjic DB, Chan LN, Tripathi V, Lu J, Kwon O, Popescu NC, Lowy DR, Tamanoi F (2013) In vitro and in vivo effects of geranylgeranyltransferase I inhibitor P61A6 on non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer* **13**: 198
- Zwald FO, Christenson LJ, Billingsley EM, Zeitouni NC, Ratner D, Bordeaux J, Patel MJ, Brown MD, Proby CM, Euvrard S, Otley CC, Stasko T (2010) Melanoma in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* **10**(5): 1297-1304



## Résumé

Ma thèse porte sur l'étude des rôles régulateurs des GTPases Rho et de leurs effecteurs ROCK sur l'expression de ligands du système immunitaire, sur des cellules de mélanomes murins et humains ainsi que les conséquences sur le développement tumoral de modulateurs de la voie RhoA/ROCK. A l'heure actuelle, les traitements du mélanome métastatique ont une efficacité limitée, c'est pourquoi les nouvelles stratégies s'orientent vers l'immunothérapie notamment en recherchant de nouvelles molécules pharmacologiques capables d'amplifier les réponses immunes anti mélanome.

Mon travail a porté sur l'étude de trois ligands de l'immunité modulés par la voie RhoA/ROCK:

- Nous avons étudié la régulation du ligand MICA qui est exprimé sur des mélanomes humains, mais qui est reconnu par les cellules NK humaines et murines du système immunitaire inné. En utilisant des statines, qui sont des inhibiteurs de l'activité des Rho, nous avons induit une surexpression membranaire de MICA sans toxicité cellulaire. Cette surexpression s'accompagne d'une sensibilisation des mélanomes à la lyse par les cellules NK. Elle induit également un ralentissement de leur croissance tumorale sous-cutanée en souris NMRI nu/nu et une diminution de l'implantation des métastases pulmonaires. Nous avons aussi montré que cette régulation de MICA induite par les statines ne dépendait pas de l'inhibition des GTPases Ras ou Rho mais de la voie de PPAR $\gamma$ .

- Nous avons ensuite étudié la régulation de la molécule de costimulation CD70 par les GTPases Rho sur des mélanomes humains et son rôle dans ces tumeurs. Nous avons montré que les mélanomes primitifs expriment CD70, que cette expression diminue au cours de la maladie et que la GTPase RhoA et la voie des MAPK contrôlent positivement l'expression de CD70 sur nos lignées de mélanome humain. De façon surprenante, nous avons aussi montré que CD70 possède une fonction non immunologique dans ces tumeurs. En effet, la trimérisation de CD70 favorise l'invasion tumorale et l'apparition de métastases en activant la voie de signalisation BRAF/MEK/ERK/RhoE et en inhibant les fibres de stress d'actine et des points focaux d'adhésion.

- Enfin, nous nous sommes intéressés aux conséquences de la modulation de FasL sur le développement tumoral du mélanome murin B16F10. Des travaux précédents de l'équipe ont montré que la protéine RhoA et ses effecteurs ROCK régulent de façon négative l'expression de FasL à la membrane des cellules B16F10. Nous avons étudié le rôle *in vivo* de la surexpression de FasL induite par l'inhibition de ROCK par le H1152. Nous avons mis en évidence un ralentissement de la croissance tumorale *in vivo* chez les souris immunocompétentes. Ce contrôle du développement tumoral est dépendant de la voie Fas/FasL et de l'activité des lymphocytes TCD8<sup>+</sup> et de l'IFN- $\gamma$ . De plus, l'inhibition de ROCK réduit le nombre de métastases pulmonaires sans intervention de la réponse immunitaire adaptative.

L'ensemble de mes travaux montre que le ciblage de la voie des GTPases Rho et de leurs effecteurs ROCK constitue une approche nouvelle pour amplifier les réponses immunes protectrices innées et adaptatives anti mélanome, suggérant que des inhibiteurs de cette voie pourraient être envisagés dans de nouveaux protocoles d'immunothérapie du mélanome.