



Influence de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse sur la réponse T cytotoxique anti-tumorale

Intissar Akalay

► **To cite this version:**

Intissar Akalay. Influence de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse sur la réponse T cytotoxique anti-tumorale. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. <NNT : 2013PA11T077>. <tel-01249387>

HAL Id: tel-01249387

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01249387>

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

École Doctorale de Cancérologie: Biologie, Médecine, Santé

Discipline: **Onco-immunologie**

Présentée et soutenue publiquement à l'Institut Gustave Roussy
le 18 Novembre 2013

Par

Intissar AKALAY

Née le 29 Août 1984

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 11

Influence de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (EMT) sur la réponse T cytotoxique anti-tumorale

Devant le jury composé de:

Pr. Jean-Paul THIERY
Dr. Annette KRAGH LARSEN
Dr. Véronique BAUD
Pr. Éric TARTOUR
Pr. Armand BENSUSSAN
Dr. Salem CHOUAIB

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

« La science? Après tout, qu'est-elle, sinon une longue et systématique curiosité? »

(André Maurois)

« Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is to not stop questioning. »

(Albert Einstein)

« L'histoire enseigne aux hommes la difficulté des grandes tâches et la lenteur des accomplissements, mais elle justifie l'invincible espoir. »

(Jean Jaurès)

« Plus les circonstances seront contre toi, plus ta force intérieure sera éclatante. »

(Vivekananda)

« Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts. »

(Winston Churchill)



Dédicaces

D'abord, à ceux sans lesquels je n'en serais certainement pas arrivée là:

À la mémoire de ma mère...

*À mon père, tu es le meilleur papa que
l'humanité ait connu... Je t'aime 😊*

À mes frères Yassine, Mohamed et Rachad... Que Dieu vous protège

À Mohamed, pour ton soutien intense et infailible durant ces années de thèse où les moments difficiles n'ont pas manqué... Dommage qu'en bon ingénieur matheux, tu ne distingues toujours pas entre un virus et une bactérie 😊.



Remerciements

Je souhaiterais exprimer ma plus profonde gratitude au Pr. Jean-Paul THIÉRY. Je le remercie des discussions enrichissantes que j'ai eu la chance d'avoir avec lui sur l'EMT, de ses conseils stimulants, et de sa réactivité exceptionnelle durant mes travaux. Merci également de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse.

J'exprime mes profonds remerciements au Dr. Véronique BAUD de l'Institut Cochin pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur.

Je remercie infiniment le Pr. Éric TARTOUR de l'hôpital George Pompidou et le Pr. Armand BENSUSSAN de l'hôpital Saint-Louis qui m'ont fait l'honneur de participer au jury de soutenance en qualité d'examineurs.

J'exprime ma plus profonde reconnaissance au directeur de l'École Doctorale de Cancérologie le Pr. Christian AUCLAIR d'avoir accepté ma candidature au sein de son École Doctorale, de ses encouragements et des discussions très enrichissantes que j'ai eu la chance d'avoir avec lui, surtout dans le cadre des réunions d'avancement du projet CAP-Oséo.

Je tiens à remercier profondément l'organisme Oséo de m'avoir financée pendant ces années de thèse ainsi que les gens avec lesquels j'ai partagé les réunions de comptes-rendus et de présentations depuis le début du projet CAP-Oséo notamment le Pr. Christian AUCLAIR, le Dr. Caroline ROBERT, le Pr. Jean-Charles SORJA, le Dr. Vanessa ROULET et le Dr. Sophie LEBEL-BINAY.

Je tiens à remercier également le Dr. Bassam JANJI de m'avoir accueilli au Centre de Recherche Publique de Luxembourg et de son optimisme qui a souvent rassuré la stressée de la vie que je suis !!

Sur le site de l'IGR, je tiens à remercier l'ingénieur de la plateforme Imagerie Sophie SALOME-DESSNOULEZ de m'avoir initiée à la microscopie confocale et de sa bienveillance. Je remercie également l'ingénieur de la plateforme Cytométrie Philippe RAMEAU de sa disponibilité même quand je prévois un passage au LSR ou au trieur au dernier moment. Un grand merci au Dr. Philippe DESSEN et au Dr. Guillaume MEURICE de l'Unité de Génomique Fonctionnelle pour les analyses bioinformatiques que ce soit pour le projet de thèse ou pour le projet CAP-Oséo.

Je remercie également le Dr. Tony Tan TUAN ZEA de l'Institut de recherche en cancérologie de Singapour pour les analyses bioinformatiques du score EMT et de l'activité de la voie de signalisation TGF- β .

Merci au Dr. Prashant KUMAR et à Nicole TSANG YING HUNG de l'Institut de biologie cellulaire et moléculaire de Singapour de s'être occupés des échantillons d'ARN que j'ai envoyés.

Au Dr. Ahmed HAMAI, même si nous nous sommes croisés au laboratoire et mon arrivée coïncidait avec la fin de sa thèse et son départ, je tiens à le remercier de m'avoir initiée au test de cytotoxicité basé sur le relargage du Cr⁵¹ pendant les premiers mois de ma thèse.

Un grand merci au Dr. Isabelle STASIK que j'ai croisée au laboratoire pendant ma première année de thèse pour ses conseils en western blot.

Un grand merci à la déesse des clones Isabelle VERGNON pour ses conseils par rapport à l'amplification des clones CTL (le fameux Feeder).

Un grand merci au Dr., dans quelques jours ☺, M'Barça MOKRANI pour les beaux moments de fous-rires et les durs moments partagés ensemble ainsi que pour certains anticorps. Je lui souhaite un brillant avenir et une vie pleine de bonheur.

Je remercie Sarah RIOU de sa gentillesse et lui souhaite bon courage pour sa thèse.

Un grand merci à Arlette GARCIA-MUNGANGA, je lui souhaite plein de belles choses pour l'avenir.

Je remercie également Fayçal DJENIDI et lui souhaite bon courage pour sa thèse.

Merci également à Gwendoline GROS, arrivée à la fin de ma thèse mais nous avons eu l'occasion de partager quelques beaux moments.

Je remercie le Dr., depuis un mois ☺, Marie BOUTET pour certains anticorps, sa bonne humeur et son sens de l'humour et lui souhaite bon courage pour son Post-Doc.

Je remercie également les autres membres de l'U753: le Dr. Jane MURET, le Dr. Jean-Henri BOURHIS, Abdou ABDERAMANE et le Dr. Yosra MESSAI.

Merci également au Dr. Sophie GAD, Audrey LEFORMAL et au Dr. Sophie COUVE de leur amabilité.

Un grand merci aux « anciens » de l'U753, Géraldine VISENTIN, Christophe PICHON et le phénoménal Jérôme LANNES ☺.

Merci à l'ancien voisin de l'équipe le Dr. Muhammad SHOAB. Je lui souhaite un très bon avenir et plein de belles choses.

Merci aux nouvelles étudiantes en thèse, les gentilles ☺: Yasmin VIRK, Ludiane GAUTHIER et Thouraya BENSAFIA. Très bon courage pour leurs thèses respectives.

Faire une thèse signifie souvent passer moins de temps avec sa famille et ses amis, je tiens donc à la fin de cette thèse à remercier tous les membres de ma famille au Maroc, ainsi que mes oncles: Kader, Hassane, Ali Idrissi et mes tantes: Sabah, Nassera, Halima et Naziha qui m'ont soutenue à mon arrivée en France il y a sept ans. Je remercie également tous mes amis d'enfance ou d'université au Maroc ainsi que mes amis en France.

Merci, merci et merci !!

Enfin, à toute personne que j'ai pu rencontrer ou croiser durant ces années de thèse et qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

<u>Table des matières</u>	1
<u>Table des illustrations</u>	5
<u>Liste des tableaux</u>	7
<u>Liste des sigles et abréviations</u>	8
<u>Avant-propos</u>	11
<u>Introduction bibliographique</u>	12
<u>I. La Transition Épithélio-Mésenchymateuse</u>	14
I.1 Définition et historique	14
I.1.1 Les cellules épithéliales	17
I.1.2 Les cellules mésenchymateuses	18
I.2 Le rôle de l'EMT dans la progression tumorale et les métastases	19
I.2.1 La cascade métastatique	19
I.2.2 Intervention de l'EMT pendant le processus métastatique	21
I.3 Les programmes responsables de l'EMT	22
I.3.1 La perte de l'expression de la E-Cadhérine: rôle des facteurs de transcription inducteurs de l'EMT	24
<i>I.3.1.1 Les mécanismes de répression de la E-Cadhérine</i>	24
I.3.2 La perte de la polarité cellulaire	27
I.3.3 Les protéases et le réseau de la Matrice Extracellulaire	27
I.4 Le rôle des miRNAs dans la régulation de l'EMT	28
I.5 L'EMT induit une résistance à l'apoptose et à la senescence	29
I.6 Le rôle de l'EMT dans l'induction des propriétés de cellules souches cancéreuses	30
I.7 Le rôle de l'hypoxie dans l'induction de l'EMT	31
I.8 L'EMT induit une résistance à la chimiothérapie	32
I.9 Le rôle de l'EMT dans la réponse immunitaire anti-tumorale	32

I.10	Les thérapies anticancéreuses ciblant l'EMT	33
II.	L'autophagie.....	37
II.1	Définition	37
II.2	La machinerie moléculaire du processus autophagique	38
II.2.1	Le complexe ATG1/UNC-51-like kinase (ULK)	39
II.2.2	Le complexe Vps34-Beclin 1	40
II.2.3	Les systèmes de conjugaison ATG12/LC3 (ATG8)	40
II.2.4	Le complexe ATG9-ATG18	41
II.2.5	La fusion autophagosome-lysosome.....	41
II.3	Les voies de signalisation majeures impliquées dans la régulation de l'autophagie ...	42
II.3.1	La kinase TOR.....	42
II.3.2	PI3-kinase/Akt	43
II.3.3	Les protéines de la famille Bcl-2.....	43
II.3.4	p53	45
II.3.5	IKK/NF-k-B	46
II.3.6	L'AMPK.....	47
II.3.7	Les MAPKs	47
II.4	Rôle de l'autophagie dans le cancer	47
II.4.1	L'autophagie comme suppresseur tumoral.....	48
II.4.2	L'autophagie comme inducteur de la survie des cellules tumorales.....	48
II.4.3	Rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire.....	51
II.4.4	Rôle de l'autophagie dans la sénescence.....	51
II.4.5	Rôle des microRNAs dans la régulation de l'autophagie.....	51
II.4.6	Rôle de l'autophagie dans l'acquisition des propriétés de cellules souches cancéreuses	53
II.4.7	Rôle de l'hypoxie dans la régulation de l'autophagie.....	54
II.4.8	L'autophagie et la réponse immunitaire anti-tumorale	55
II.4.9	L'autophagie dans les essais cliniques:	56

<u>III. Développement de la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique</u>	60
III.1 Différenciation des effecteurs T cytotoxiques anti-tumoraux.....	60
III.1.1 Différenciation des lymphocytes T CD8+ en effecteurs cytotoxiques	61
III.2 Recherche de la cible tumorale.....	63
<u>IV. Les effecteurs T cytotoxiques de la réponse immunitaire anti-tumorale</u>	66
IV.1 La synapse immunologique et son rôle dans l'activation lymphocytaire T.....	66
IV.1.1 La synapse immunologique « mature »	66
IV.2 Induction de l'activité lytique des effecteurs cytotoxiques.....	68
IV.2.1 La synapse sécrétoire ou « Baiser de la mort »	68
<i>IV.2.1.1 Constitution des granules cytotoxiques</i>	70
<i>IV.2.1.2 Polarisation du MTOC.....</i>	72
<i>IV.2.1.3 Circulation et exocytose des granules cytotoxiques</i>	72
<i>IV.2.1.4 Sécrétion des chimiokines et cytokines.....</i>	75
IV.2.2 Voie de cytotoxicité Perforine/granzyme	75
IV.2.3 Voie des récepteurs à domaine de mort	79
IV.3 Echappement tumoral à l'immuno-surveillance.....	80
IV.3.1 Mécanismes d'échappement inhérents aux effecteurs T CD8+.....	82
<i>IV.3.1.1 Altération du priming des lymphocytes T.....</i>	82
<i>IV.3.1.2 Inhibition de l'activité lytique des cellules cytotoxiques</i>	82
<i>IV.3.1.3 Délétion des lymphocytes T.....</i>	83
IV.3.2 Mécanismes d'échappement intrinsèque à la tumeur	84
<i>IV.3.2.1 Défaut de présentation antigénique.....</i>	84
<i>IV.3.2.2 Perte de l'expression des molécules d'adhésion</i>	84
<i>IV.3.2.3 Résistance à la voie Perforine/Granzyme.....</i>	85
<i>IV.3.2.4 Expression de molécules inflammatoires.....</i>	85
IV.3.3 Le microenvironnement tumoral	86
<i>IV.3.3.1 Les cellules T régulatrices</i>	86
<i>IV.3.3.2 Les cellules suppressives dérivées des myéloïdes</i>	87
<i>IV.3.3.3 Les macrophages associés aux tumeurs.....</i>	87

IV.3.3.4	<i>Les cellules NKT</i>	87
IV.3.3.5	<i>Les lymphocytes B</i>	88
	Objectifs des travaux	89
	Modèles expérimentaux	91
	Résultats	94
	Partie I : Akalay I <i>et al.</i> , 2013a.....	95
	Partie II : Akalay I <i>et al.</i> , Manuscript submitted for publication.....	115
	Discussion générale	150
	Conclusions et perspectives	162
	Annexes	168
	Annexe I.....	169
	Annexe II.....	209
	Références bibliographiques	216

Table des illustrations

Figure 1: Histoire de la recherche sur l'EMT	15
Figure 2: Le processus de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse	15
Figure 3: Les différents types de l'EMT	17
Figure 4: Organisation apico-basale des cellules épithéliales et représentation des contacts cellule-cellule.....	18
Figure 5: Les événements moléculaires au niveau des jonctions cellulaires dans une cellule mésenchymateuse	19
Figure 6: Les principales étapes de la formation de métastases	20
Figure 7: Intervention de l'EMT au cours de la cascade métastatique.....	22
Figure 8: Complexité des voies de signalisation régulant l'EMT	23
Figure 9: Vue schématique du mécanisme de répression du gène codant pour la E-Cadhérine (CDH1) par les facteurs de transcription inducteurs de l'EMT.....	25
Figure 10: Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de Snail	26
Figure 11: La boucle de régulation rétroactive de ZEB/miR-200	29
Figure 12: L'acquisition du phénotype mésenchymateux induit une diminution de la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques via l'induction de l'autophagie	33
Figure 13: Les différents types d'autophagie dans les cellules mammifères	37
Figure 14: Les étapes du processus autophagique.....	38
Figure 15 : Représentation schématique de la régulation moléculaire des différentes étapes du processus autophagique	42
Figure 16: Les voies de signalisation majeures impliquées dans la régulation de l'autophagie.....	44
Figure 17: Le double rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie	45
Figure 18: Le rôle de la voie IKK-NF- κ B dans la régulation de l'autophagie.....	46
Figure 19: Le double rôle de l'autophagie dans la progression tumorale	50
Figure 20: Les miRNAs impliqués dans la régulation du processus autophagique	53
Figure 21: L'autophagie et la réponse immunitaire.....	56
Figure 22: l'immuno-surveillance anti-tumorale.....	60
Figure 23: Différenciation des lymphocytes T CD8+	62
Figure 24: Vue générale de la synapse immunologique mature.....	67
Figure 25: Polarisation des granules cytotoxiques à la SI cytotoxique : un processus multi-étapes....	69

Figure 26: Polarisation et exocytose des granules cytotoxiques	73
Figure 27: Les différentes voies de mort initiées par le granzyme B	78
Figure 28: Le concept d'« immunoediting »	81
Figure 30: Comparaison de la susceptibilité des cellules épithéliales <i>versus</i> mésenchymateuses à la lyse par les cellules NK.	156
Figure 31: La transfection de la lignée primitive de mélanome T1, sensible à la lyse par les CTLs, avec Snail induit une diminution de sa susceptibilité à la lyse.	158
Figure 32: Les éléments du microenvironnement tumoral favorisant l'émergence d'un milieu immunosuppresseur favorable à la croissance des cellules tumorales.	159
Figure 33: Induction de l'expression des marqueurs de l'EMT dans la lignée épithéliale MCF7 suite à la co-culture avec les TAM dérivés de la lignée monocyttaire THP1	160
Figure 34: Induction de l'expression du marqueur de cellules souches cancéreuses OCT4 dans la lignée épithéliale MCF7 suite à sa co-culture avec les TAM dérivés de la lignée monocyttaire THP1	161
Figure 35: Validation par qRT-PCR de la régulation négative de l'expression de la chaperonne Tapasine suite à l'induction de l'EMT.	164

Liste des tableaux

Tableau 1: L'expression des métalloprotéases matricielles et leur régulation dans des modèles d'EMT in-vitro..	28
Tableau 2: Les protéines majeures régulatrices de l'autophagie dans les cellules mammifères.	39
Tableau 3: L'utilisation de l'Hydroxychloroquine dans des essais cliniques et la modulation de l'autophagie.	58
Tableau 4: La régulation négative de l'expression de la chaperonne Tapasine suite à l'induction de l'EMT	164
Tableau 5: Impact de l'hypoxie sur la régulation des gènes liés à l'EMT dans la lignée cellulaire MCF7.	167

Liste des sigles et abréviations

ABC <i>ATP-binding cassette</i>	Crb <i>Crumbs homolog</i>
ADN <i>acide désoxyribonucléique</i>	CSC <i>Cancer Stem Cells</i>
Ag <i>Antigène</i>	CTBP-1/2 <i>C-terminal-binding protein 1/2</i>
AKT <i>Also called PKB, Protein Kinase B</i>	CTL <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
ALDH <i>Aldehyde dehydrogenase</i>	CTLA-4 <i>CTL Associated Antigen-4</i>
Alpha-PKC <i>Protein kinase C alpha</i>	CXCL <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
AMPK <i>AMP-activated protein kinase</i>	DAPK <i>Death-associated protein kinase</i>
ARN <i>Acide Ribonucléique</i>	DC <i>Dendritic Cell</i>
ATG <i>AuTophagie</i>	DD <i>Death Domain</i>
ATP <i>Adénosine 5'-Triphosphate</i>	DED <i>Death-Effector Domain</i>
BATF3 <i>basic leucine zipper transcription factor3</i>	DEPTOR <i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
Bax <i>Bcl-2 associated X protein</i>	DISC <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
BAK <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>	Dlg <i>Disks large homolog</i>
Bcl-2 <i>B cell lymphoma 2</i>	DR <i>Death Receptor</i>
BCSCs <i>Breast Cancer Stem Cells</i>	EGF <i>Epidermal Growth Factor</i>
BH <i>Bcl-2-Homology</i>	IFN <i>Interferon</i>
BID <i>BH3-interacting domain death agonist</i>	EMT <i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>
Bif-1 <i>Bax-interacting Factor 1</i>	ER <i>Eostrogen Receptors</i>
BMI1 <i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>	ERK-1/2 <i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
CAF <i>Cancer Associated Fibroblasts</i>	FADD <i>Fas-Associated Death Domain</i>
CCL <i>CC chemokine ligands</i>	FAK <i>Focal Adhesion Kinase</i>
CCN <i>CYR61, CTGF and NOV</i>	Fas L <i>Fas Ligand</i>
CCR <i>C-C chemokine receptor</i>	FGF <i>Fibroblast growth factors</i>
CD <i>Cellules Dendritiques</i>	FOXC2 <i>Forkhead box protein C2</i>
Cdc <i>Cell division cycle</i>	FOXQ1 <i>Forkhead Box Protein Q1</i>
CDKN2A <i>Cyclin Dependent Kinase2A</i>	G-CSF <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
CMA <i>Chaperone-mediated autophagy</i>	GM-CSF <i>Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Fator</i>
CMH <i>Complexe Majeur d'Histocompatibilite</i>	COX <i>Cyclooxygenase</i>
CPA <i>Cellule Présentatrice d'Antigène</i>	

GrB <i>Granzyme B</i>	LYST <i>Lysosomal Trafficking Regulator</i>
GSK3-beta <i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>	MALT <i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein</i>
GTPases <i>Guanosine-5'-triphosphatases</i>	MAPK <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
HCQ <i>Hydroxychloroquine</i>	MCF7 <i>Michigan Cancer Foundation 7</i>
HDAC-1/2 <i>Histone deacetylases 1/2</i>	Mcl-1 <i>Myeloid cell leukaemia 1</i>
Her2/neu <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>	MDSC <i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
HEV <i>Hepatitis E virus</i>	MEC <i>Matrice Extra-Cellulaire</i>
HIF <i>Hypoxia Inducible Factors</i>	MET <i>Mesenchymal to Epithelial Transition</i>
HMGB1 <i>High-mobility group protein B1</i>	MICA <i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>
ICAD <i>Inhibitor of CAD</i>	MIP <i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
ICAM <i>Intercellular adhesion molecule-1, also called CD54</i>	MMP <i>Matrix Metalloproteinase</i>
IDO <i>Indoleamine-2,3-Dioxygenase</i>	MPR <i>Mannose-6-Phosphate Receptor</i>
IFN <i>Interferon</i>	MTOC <i>MicroTubule Organizing Center</i>
IKK <i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>	MUC1 <i>Mucin 1</i>
IL <i>Interleukin</i>	NADH <i>Dihyronicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
ILK <i>Integrin-Linked Kinase</i>	NF-κB <i>Nuclear Factor- κB</i>
iNOS <i>Nitric oxide synthases</i>	NGFR <i>Nerve Growth Factor Receptor</i>
JAK2 <i>Janus kinase 2</i>	NK <i>Natural Killer</i>
JAM <i>Junctional adhesion molecule</i>	OCT4 <i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
JNK <i>c-JUN NH2 terminal Kinase</i>	PARP-1 <i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
KLF4 <i>Kruppel-like factor 4</i>	PATJ <i>PALS1-associated TJ protein</i>
LAMP-1 <i>Lysosomal-associated membrane protein-1</i>	PDGFR <i>Platelet-derived growth factor receptors</i>
LAT <i>The Linker for Activation of T cells</i>	PDK <i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>
LC-3 <i>Light Chain-3</i>	PDL-1 <i>Programmed cell death ligand 1</i>
LCK <i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>	PE <i>Phosphatidylethanolamine</i>
LFA-1 <i>Lymphocyte-function-associated antigen-1</i>	PGE <i>Prostaglandin E</i>
Lgl <i>Lethal Giant Larvae</i>	PI <i>Propidium iodide</i>
LHF <i>L cells expressing Fas</i>	PI-9 <i>Protease Inhibitor-9</i>
	PI3K <i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase</i>
	PKB <i>Protein Kinase B</i>

PKC-δ <i>Protein kinase C-δ</i>	TCF3 <i>Transcription factor 3</i>
PLC <i>Phospholipase C</i>	TCR <i>T Cell Receptor</i>
PMA <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate</i>	TGF-beta <i>Transforming Growth Factor-beta</i>
PR <i>Progesterone Receptors</i>	Th <i>Helper T cell</i>
PRAS40 <i>Proline rich Akt substrate 40 kDa</i>	TIGAR <i>TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator</i>
PTEN <i>Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten</i>	TIL <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
PTK <i>Protein tyrosine kinase</i>	TLR <i>Toll Like Receptor</i>
Ras <i>Rat sarcoma</i>	TNF <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Rheb <i>Ras homolog enriched in brain</i>	TOR <i>Target Of Rapamycin</i>
RhoA <i>Ras homolog gene family, member A</i>	TP53 <i>Tumor Protein p53</i>
ROS <i>Reactive Oxygen Species/Espèces Réactives de l'Oxygène</i>	TRADD <i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i>
TAK1 <i>TGF-beta activated kinase 1</i>	TRAIL <i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
RTK <i>Récepteurs à activité à Tyrosine Kinase</i>	Treg <i>Regulatory T cells</i>
S1P <i>Sphingosine-1-phosphate</i>	TSC-1/2 <i>Tuberous Sclerosis 1</i>
SCP <i>Single-cell protein</i>	UVRAG <i>UV Radiation Resistance Associated Gene</i>
Shh <i>Sonic Hedgehog</i>	VEGF <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
SHP-1 <i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>	VHL <i>Von Hippel-Lindau</i>
SI <i>Synapse Immunologique</i>	WIP <i>WASP-interacting protein</i>
SLP <i>Synaptotagmin-Like Protein</i>	WISP2 <i>WNT1-inducible-signaling pathway protein 2</i>
SMAC <i>SupraMolecular Activation Cluster</i>	ZAP <i>Zeta-Associated Protein</i>
SNARE <i>Soluble NSF Attachment Protein Receptor</i>	ZEB <i>Zinc-finger enhancer binding</i>
SQSTM1 <i>Sequestosome-1</i>	ZO-1/2/3 <i>Zonula Occludens Protein-1/2/3</i>
STAT <i>Signal Transducer and Activation of Transcription</i>	
STMN1 <i>Stathmin 1</i>	
SUZ12 <i>Suppressor of Zeste-12 protein</i>	
TAA <i>Tumor Associated Antigen</i>	
TAM <i>Tumor Associated Macrophages</i>	
TAP <i>Transporter associated with Antigen Processing</i>	

Avant-propos

Ces dernières années ont vu se concrétiser des avancées capitales dans le domaine de l'immunologie anti-tumorale, permettant ainsi de mettre en lumière le processus d'immunosurveillance anti-tumorale. Et pourtant, il est toujours rare que l'induction d'une réponse immunitaire au sein de la tumeur éradique les cellules malignes. La réponse cytotoxique spécifique au site tumoral demeure le plus souvent inefficace, et ce malgré les efforts engagés à l'heure actuelle à travers différentes stratégies d'immunothérapie anti-tumorale pour renforcer cette réponse.

Ainsi, et vu les données expérimentales récentes, il est d'une importance majeure de considérer la susceptibilité tumorale à la lyse par les effecteurs cytotoxiques anti-tumoraux, et principalement les lymphocytes T cytotoxiques. En effet, cette susceptibilité représente un déterminant essentiel de la réponse cytotoxique anti-tumorale. Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité à échapper à l'immunosurveillance en développant différents mécanismes de résistance au système immunitaire liés à la plasticité microenvironnementale. En particulier, les cellules tumorales peuvent devenir résistantes à la lyse induite par les lymphocytes T cytotoxiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrit l'axe principal de mon projet de thèse visant l'analyse de certaines conséquences de la plasticité tumorale, notamment l'impact du processus de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (EMT) sur la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les lymphocytes TCD8⁺ et les mécanismes associés à l'éventuelle résistance des cellules tumorales mésenchymateuses à ces effecteurs de la réponse immunitaire. À plus long terme, cette étude a pour visée d'aider à concevoir des approches permettant l'atténuation de la résistance tumorale à l'un des composants clés de la réponse immunitaire anti-tumorale, les CTLs.

La première partie de ce manuscrit présente les connaissances actuelles sur le rôle de l'EMT dans la tumorigénèse, la deuxième partie consiste en la présentation du rôle de l'autophagie dans le cancer, et la troisième partie est consacrée à la synthèse des connaissances sur le développement d'une réponse immunitaire spécifique anti-tumorale efficace, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'induction de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ ainsi que les mécanismes de résistance au système immunitaire développés par les cellules cancéreuses au cours de la progression tumorale. Dans une seconde partie, l'ensemble des résultats sera présenté et discuté sous forme d'articles. Ensuite, suivront une discussion générale, des conclusions et des perspectives.



Introduction bibliographique

Chapitre I

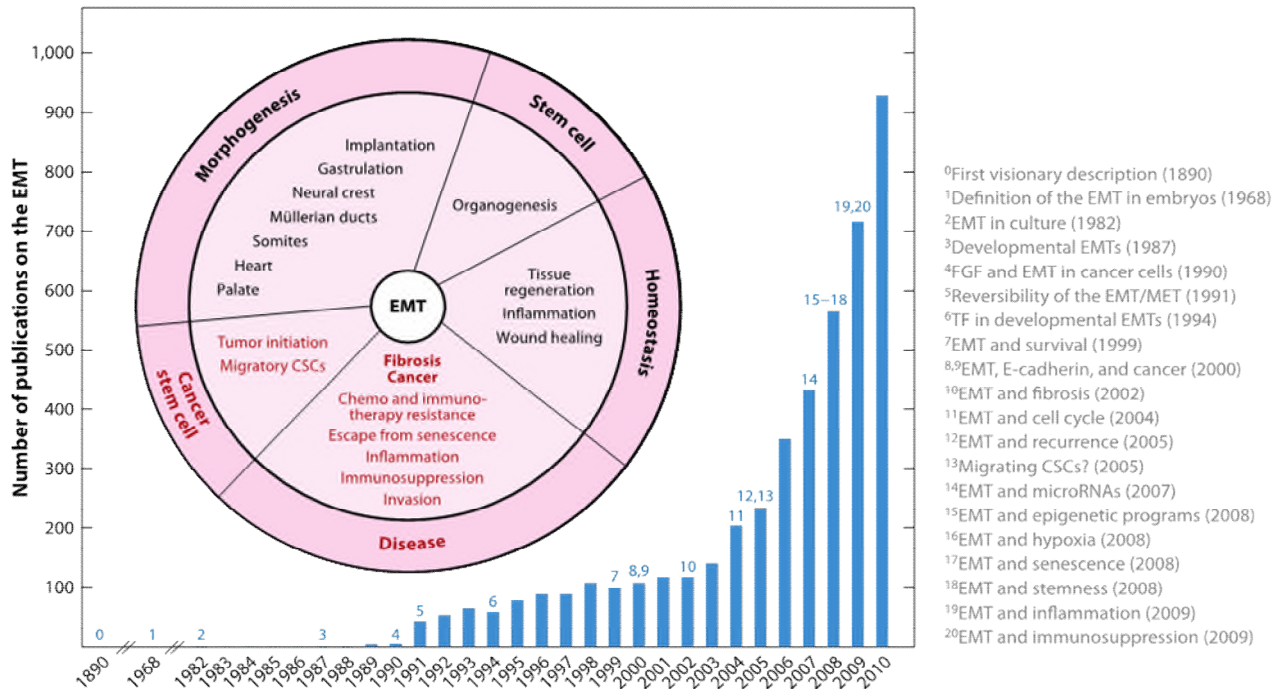


I. La Transition Épithélio-Mésenchymateuse

I.1 Définition et historique

La plupart des tissus adultes et des organes proviennent d'une série de conversions de cellules épithéliales aux cellules mésenchymateuses à travers le processus de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (EMT) (Greenburg and Hay, 1982) et du processus inverse, la Transition Mésenchymo-Épithéliale (MET) (Potts and Runyan, 1989).

À la fin du 19^e siècle, les cellules mésenchymateuses et épithéliales ont été distinguées par leur phénotype. Bien que l'EMT fût évidente pour les biologistes du développement (Platt, 1894), elle n'était devenue intéressante à leurs yeux que pendant les années 1960 (**Figure 1**). Néanmoins, les études sur l'EMT sont restées limitées pendant de nombreuses années jusqu'à ce que la pertinence de l'EMT dans le domaine du cancer ait été reconnue (Polyak and Weinberg, 2009; Tarin et al., 2005) (**Figure 1**). L'importance de l'EMT dans le cancer est actuellement largement acceptée par les pathologistes. Ainsi, les chercheurs en oncologie ont adopté ce processus et l'ont considéré comme l'un des processus les plus importants à comprendre. Depuis, la connexion entre le cancer et l'EMT a été une force motrice majeure qui a stimulé les progrès réalisés dans ce domaine (**Figure 1**). Par conséquent, plusieurs résultats importants ont aidé à construire les piliers de la compréhension de l'EMT et de son rôle dans la progression tumorale (**Figure 1**). Après des années consacrées à l'analyse in-vitro de l'EMT, les inducteurs de ce processus ainsi que sa réversibilité (MET) ont été découverts (Potts and Runyan, 1989; McCarthy and Hay, 1991). Par la suite, des études ont identifié les facteurs de croissance capables de déclencher le processus de l'EMT (Nieto et al., 1994) ainsi que les programmes cellulaires contrôlés par ces inducteurs (Inukai et al., 1999; Vega et al., 2004). Les réseaux compliqués régulant l'EMT sont apparus plus tard (Dumont et al., 2008; Gregory et al., 2008). Ensuite, de nouveaux concepts tels que celui de l'acquisition des propriétés de cellules souches cancéreuses suite à l'induction de l'EMT ont été découverts (Brabletz et al., 2005). Ceci a provoqué une expansion rapide de l'intérêt de l'étude du rôle de l'EMT dans la progression tumorale (**Figure 1**).



Plus de 100 ans se sont écoulés entre la première description de l'EMT, son implication dans le cancer (1890) et la découverte de son implication dans la cascade métastatique (2000). Au cours des 5 dernières années, 20% des travaux ont été publiés en 2010. Le cercle intérieur de la figure met en évidence le rôle central de l'EMT dans la physiologie (noir) et la pathologie (rouge). (D'après Nieto A, Cell Dev Biol, 2011).

Les travaux de l'équipe du Dr. Hay ED en 1967 sont les premiers à décrire l'EMT en montrant que les cellules épithéliales perdent leur polarité apico-basale, les jonctions intercellulaires et qu'elles subissent des changements au niveau de la forme et de l'organisation du cytosquelette au cours de l'EMT (Trelstad et al., 1967; Greenburg and Hay, 1982) (Figure 2).

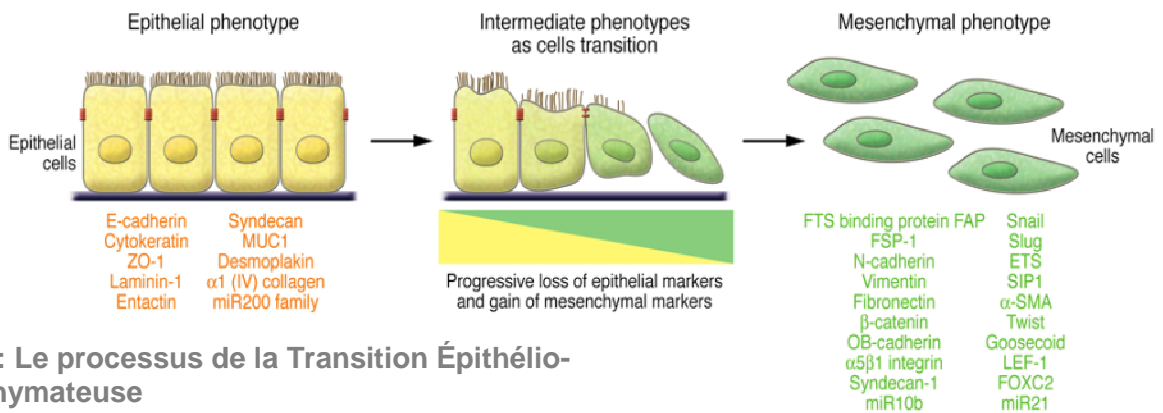


Figure 2: Le processus de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse

L'EMT implique une transition des cellules épithéliales polarisée à des cellules mésenchymateuses mobiles. Les marqueurs épithéliaux et mésenchymateux communément utilisés par les chercheurs sont listés. La co-expression d'un marqueur épithélial et un marqueur mésenchymateux à la fois définit un phénotype intermédiaire de l'EMT. Ceci indique que les cellules peuvent subir une EMT partielle. ZO-1: Zona Occludens 1; MUC1: Mucin 1; SIP1: Survival of motor neuron protein Interacting Protein 1; FOXC2: Forkhead box C2. (Adapté de Kalluri R et Weinberg R, J Clin Invest, 2009).

L'EMT se caractérise par des changements de la polarité cellulaire et de l'adhésion qui perturbent la membrane épithéliale basale et permettent la pénétration des cellules dans un compartiment riche en matrice extracellulaire: un processus connu sous le nom de délamination (Lim and Thiery, 2012). En effet, durant l'embryogenèse, de nombreux signaux extracellulaires peuvent convertir les cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses via l'EMT. Sans cette dernière, le développement de l'organisme ne dépassera pas le stade blastula. Il s'agit d'une transition qui fait partie intégrante de certains processus morphogénétiques et organogénétiques. Ainsi, les mouvements de gastrulation dans de nombreuses espèces, la sortie des cellules de la crête neurale à partir du tube neural, et la formation des valves cardiaques sont quelques exemples du processus embryonnaires faisant appel à l'EMT (Thiery and Sleeman, 2006; Peinado et al., 2003) (**Figure 3A**).

Bien que l'EMT ait été décrite initialement au cours de l'embryogenèse, les changements phénotypiques et moléculaires de la cellule épithéliale sont également caractéristiques de deux processus pathologiques : la néoplasie et la fibrose.

Ainsi, sur la base de ses rôles, l'EMT peut être classée en trois différents sous-types: L'EMT de type 1 est associée à l'implantation embryonnaire, la gastrulation et la mobilité des cellules de la crête neurale. L'EMT de type 2 est impliquée dans la cicatrisation des plaies, la régénération des tissus, l'inflammation et la fibrose. Et enfin, l'EMT de type 3 représente la conversion de cellules épithéliales cancéreuses à des cellules mésenchymateuses invasives. Ces dernières sont capables de migrer et de conduire à la dissémination des cellules tumorales et aux métastases (Kalluri and Weinberg, 2009) (**Figure 3**).

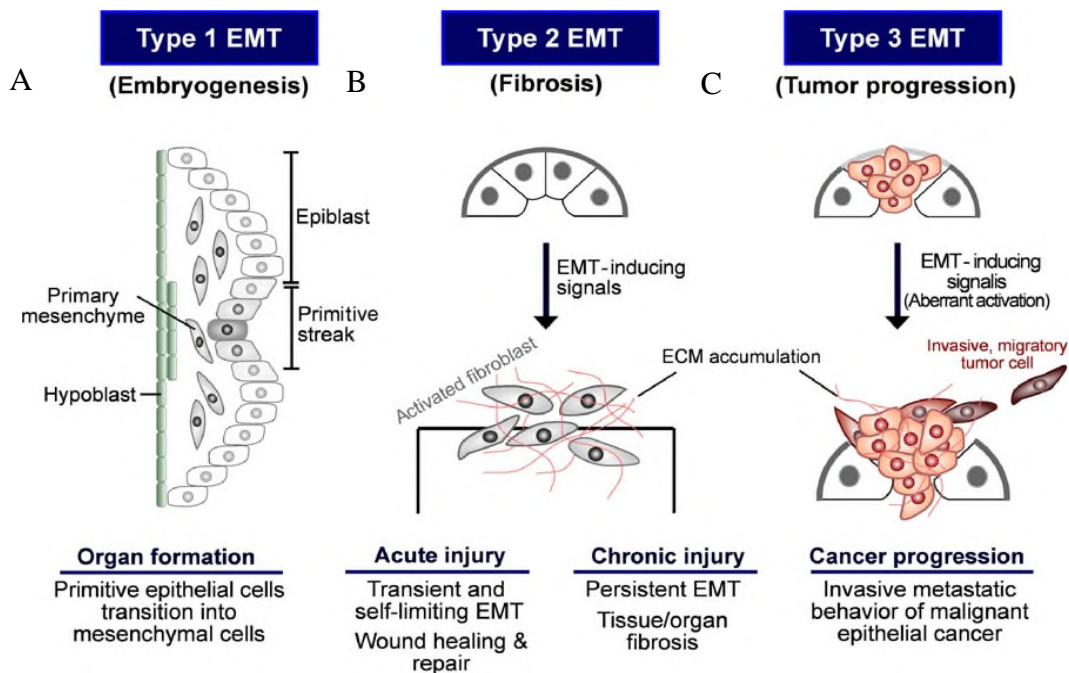


Figure 3: Les différents types de l'EMT

A) L'EMT de type 1 est associée à l'implantation et la gastrulation embryonnaires et donne ainsi naissance au mésoderme, à l'endoderme et aux cellules de la crête neurale. L'épithélium primitif, en particulier l'épiblaste donne naissance au mésenchyme primaire via l'EMT. B) L'EMT de type 2 est induite dans le cas de l'inflammation et de la fibrose. C) Enfin, l'EMT de type 3 est associée à la transformation de cellules cancéreuses, à l'invasion et aux métastases. (D'après Lee K et Nelson C, Cell and Mol Biol, 2012).

Pour comprendre le phénomène de l'EMT, il est nécessaire d'évoquer les caractéristiques des cellules épithéliales et mésenchymateuses.

I.1.1 Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales adhèrent entre elles grâce à des structures spécialisées à savoir les jonctions serrées, les desmosomes et les jonctions adhérentes, formant ainsi une couche de cellules. Ces cellules ont une polarité apico-basale caractérisée par la localisation des protéines spécifiques à des domaines spécifiques de la membrane cellulaire. Cette localisation nécessite à la fois le recrutement de protéines cytoplasmiques à la membrane et le transport des vésicules polarisées le long des filaments du cytosquelette. Les molécules responsables de la régulation de la polarité cellulaire incluent le complexe PAR (Cdc42, PAR3, PAR6, la protéine atypique kinase C), le complexe Crumbs (Crb, l'EPLA, PATJ, Lin7), et le complexe Scribble (Scrib, la DLG, Lgl) (Bryant and Mostov, 2008). Ces complexes sont localisés du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire. Dans les cellules épithéliales, les complexes PAR et Crumbs sont localisés le long de la membrane

apicale, tandis que le complexe Scribble est localisé le long de la membrane latérale (St Johnston and Ahringer, 2010). Avec un groupe de molécules de signalisation appelée Rho GTPases, ces complexes de polarité peuvent réguler le transport des vésicules polarisées le long des filaments du cytosquelette. Cette polarisation apico-basale confère aux cellules une organisation en une « ceinture » latérale grâce aux jonctions cellules-cellules, à l'architecture du cytosquelette d'actine et à l'association aux protéines de la membrane basale comme les laminines (**Figure 4**). Ces cellules épithéliales sont mobiles, mais elles ne se détachent pas les unes des autres. Dans les conditions normales, ces cellules se déplacent en une seule couche.

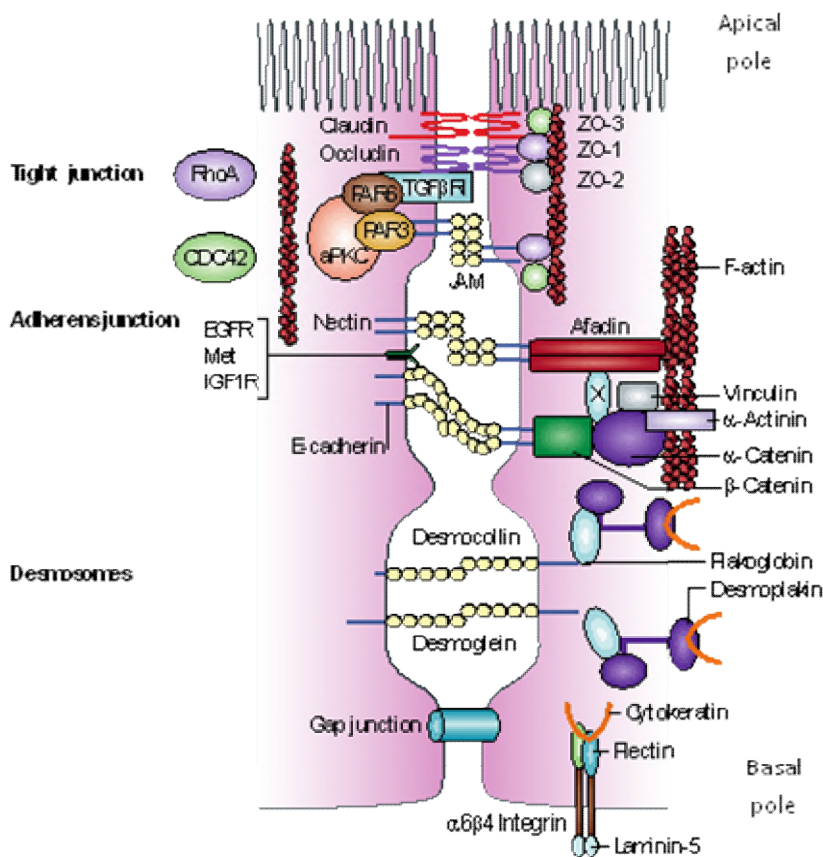


Figure 4: Organisation apico-basale des cellules épithéliales et représentation des contacts cellule-cellule

Organisation moléculaire des jonctions serrées (Tight Junctions), des jonctions adhérentes (Adherens Junctions), des desmosomes et des jonctions communicantes (Gap Junctions) avec la disposition principale des E-Cadhérines. JAM: junctional adhesion molecule. αPKC: atypical protein kinase C. PAR3/6: partitioning-defective protein-3/6. ZO-1/2/3: zonula occludens-1/2/3. (Adapté de Thiery JP et Sleeman J, Molecular Cell Biol, 2006).

I.1.2 Les cellules mésenchymateuses

Les cellules mésenchymateuses ne forment pas une couche cellulaire, n'ont pas la polarité apico-basale ni l'organisation du cytosquelette observée dans les cellules épithéliales. En effet, les filaments d'actine forment un réseau cortical et la vimentine est exprimée en tant que filament intermédiaire. Les contacts intercellulaires ne se font qu'à l'aide des points focaux et ces cellules ne sont pas toujours associées à une membrane basale.

Ainsi, la caractéristique centrale de l'EMT est la réduction des contacts cellules-cellules par la perte des E-cadhérines (protéines majeures des jonctions adhérentes), des occludines et claudines (jonctions serrées) et de la desmoplakine (desmosomes). La β -caténine est également modulée par la perte des contacts cellulaires régis par les E-cadhérines et subit une délocalisation dans le noyau où elle exercera son activité en potentialisant la transcription des éléments importants dans l'EMT (Stemmer et al., 2008). Les fibres d'actines du cytosquelette seront remplacées par les fibres de stress dont l'extrémité comporte certaines molécules d'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC) comme les intégrines (**Figure 5**). L'ensemble de ces modifications est suffisant pour permettre la séparation des cellules, la perte de leur polarité apico-basale et l'acquisition du pouvoir migratoire.

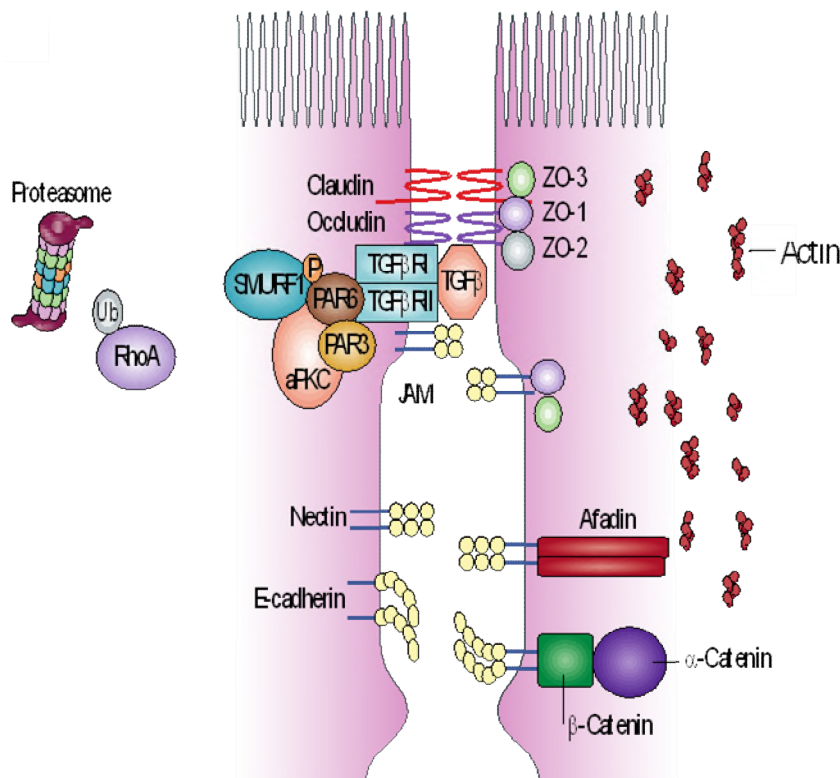


Figure 5: Les événements moléculaires au niveau des jonctions cellulaires dans une cellule mésenchymateuse

Les complexes jonctionnels intacts dans les cellules épithéliales (Figure 5) sont dissociés (Figure 6). Le TGF-beta peut dissocier les jonctions serrées via la dégradation de RhoA et la dépolymérisation des filaments d'actine. JAM: junctional adhesion molecule. aPKC: atypical protein kinase C. PAR3/6: partitioning-defective protein-3/6. ZO-1/2/3: zonula occludens-1/2/3. (Adapté de Thiery JP et Sleeman J, Molecular Cell Biol, 2006).

I.2 Le rôle de l'EMT dans la progression tumorale et les métastases

I.2.1 La cascade métastatique

Les métastases tumorales sont la cause la plus fréquente de décès des patients atteints de cancer.

Le processus métastatique comprend des étapes distinctes. La première étape est l'invasion, elle se caractérise par la perte du contact intercellulaire et le gain de la motilité par les cellules épithéliales néoplasiques, ce qui leur permet d'envahir les tissus adjacents. Au cours de la deuxième étape

nommée intravasation, les cellules tumorales pénètrent à travers l'endothélium des vaisseaux sanguins ou lymphatiques pour entrer dans la circulation systémique. Seules quelques cellules tumorales circulantes semblent être en mesure de survivre pendant le passage dans la circulation. Parmi ces cellules, seulement certaines parviennent à terminer l'étape suivante, nommée extravasation. Alors, elles s'extravasent à travers l'endothélium capillaire pour atteindre des sites distants. Enfin, dans le nouvel environnement-hôte, un ensemble encore plus restreint de cellules tumorales métastatiques parviennent à proliférer à partir des micro-métastases pour donner naissance aux tumeurs secondaires malignes (Fidler, 2003) (**Figure 6**). L'EMT fait donc partie des programmes activés dans les cellules cancéreuses durant le processus métastatique.

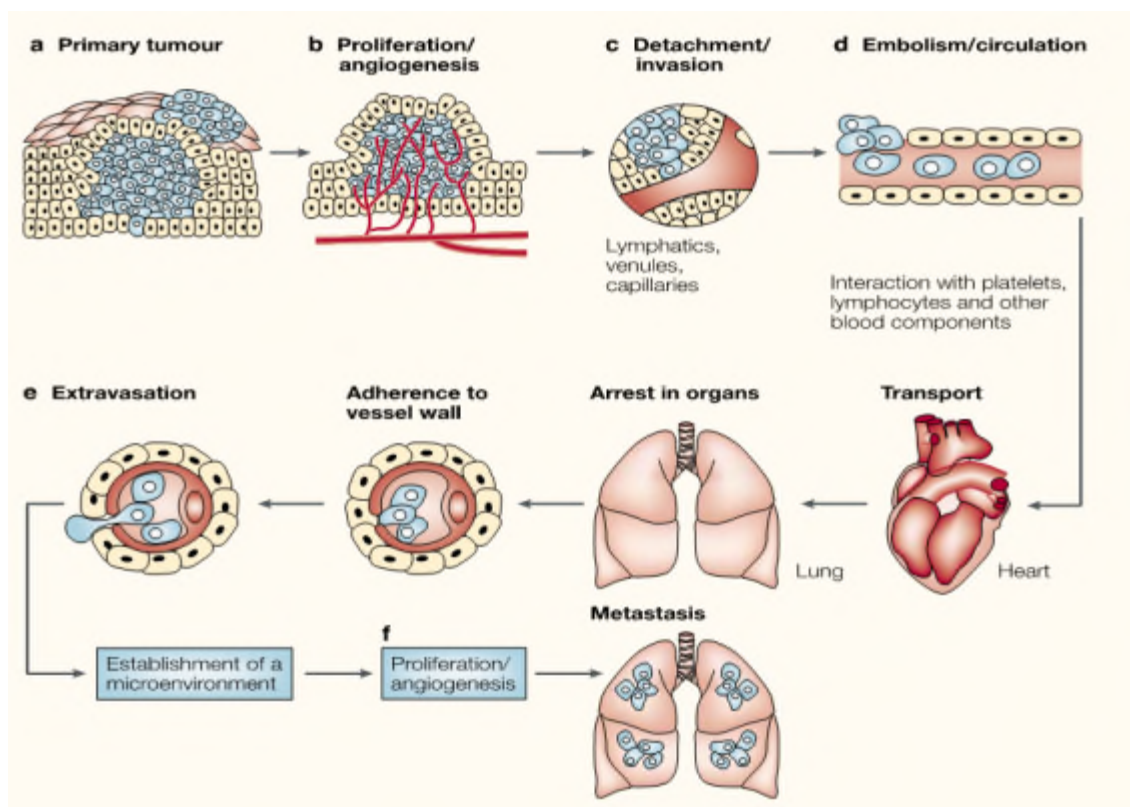


Figure 6: Les principales étapes de la formation de métastases

a) Transformation cellulaire et croissance de la tumeur. La croissance des cellules néoplasiques est progressive. b) Une vascularisation se produit si la masse tumorale dépasse 1-2 mm de diamètre. La synthèse et la sécrétion de facteurs angiogéniques permet d'établir un réseau capillaire à partir de tissus environnants. c) L'invasion locale du stroma tumoral par certaines cellules tumorales se produit en parallèle avec plusieurs mécanismes. Les veinules à paroi mince, telles que les canaux lymphatiques, ne résistent pas à la pénétration par les cellules tumorales et fournissent un chemin pour l'entrée des cellules tumorales dans la circulation. d) Ensuite, le détachement des cellules tumorales se produit. La plupart des cellules tumorales circulantes sont détruites. Celles qui survivent deviennent piégées dans les structures capillaires des organes distants tout en adhérant soit aux cellules capillaires endothéliales soit à la membrane endothéliale basale. e) L'extravasation est induite via les mêmes mécanismes qui opèrent durant l'étape de l'invasion. f) La prolifération via le parenchyme complète le processus métastatique. Pour que ces cellules poursuivent leur croissance, les micro-métastases doivent développer un réseau vasculaire et échapper à la destruction par les mécanismes de sauvegarde de l'hôte. Ainsi, ces cellules peuvent envahir les vaisseaux sanguins, entrer dans la circulation et donner naissance à d'autres métastases. (D'après Fidler I, Nature, 2003).

I.2.2 Intervention de l'EMT pendant le processus métastatique

En effet, au cours des dernières années, l'EMT a été reconnue comme une étape cruciale dans la cascade métastatique (Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Elle corrèle avec l'invasion, le mauvais pronostic et les types les plus agressifs du cancer, tels que les carcinomes mammaires de type basal (Sarrío et al., 2008). De plus, certaines études ont démontré que les cellules cancéreuses invasives exprimant des marqueurs mésenchymateux possèdent un taux de prolifération atténué et qu'elles sont résistantes à la mort cellulaire (Vega et al., 2004; Roussos et al., 2010). Ces propriétés permettent une migration efficace des cellules tumorales invasives après avoir accompli l'EMT et confèrent ainsi un avantage sélectif pour atteindre les sites distants.

Des études réalisées en utilisant la microscopie multiphotonique *in-vivo* ont décrit la délamination des cellules individuelles à partir de la tumeur primaire, leur migration suivant les fibres de la matrice extracellulaire, et leur intravasation assistée par des macrophages (Wyckoff et al., 2007). Ceci a soulevé la question concernant la nécessité de l'EMT pour l'intravasation. Sur cet appui, une étude a démontré que les cellules tumorales mammaires subissant une migration collective sont susceptibles d'envahir les vaisseaux lymphatiques, alors qu'individuellement ces cellules migrent pour envahir à la fois les vaisseaux lymphatiques et sanguins (Giampieri et al., 2009). Par conséquent, seules les cellules individuelles semblent être en mesure de se propager dans la circulation sanguine. Quant aux cellules tumorales qui restent regroupées, elles pourraient intravaser suite à la sécrétion d'un facteur de croissance inducteur de l'EMT (TGF- β) par les TAM (Tumor-Associated Macrophages) ou les CAF (Cancer-Associated Fibroblasts). Ainsi, ces cellules regroupées changent leur comportement et migrent individuellement via l'EMT comme c'est décrit dans le cas de cancer du sein (Giampieri et al., 2009) (**Figure 7**).

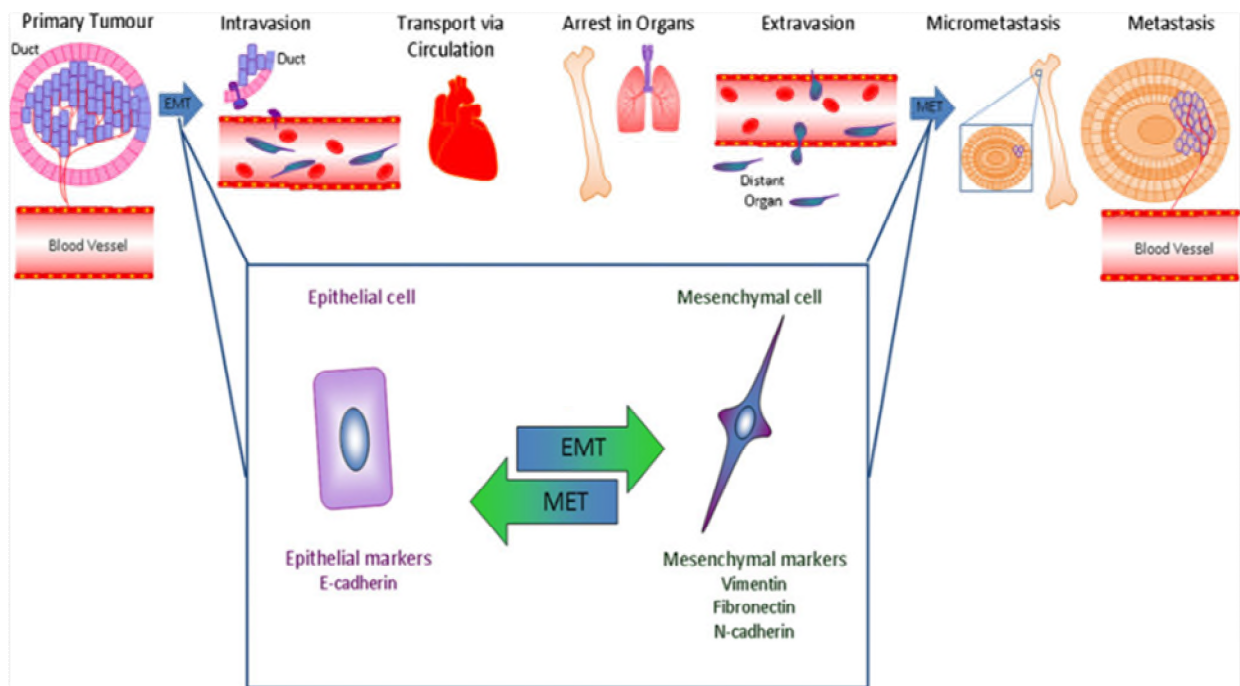


Figure 7: Intervention de l'EMT au cours de la cascade métastatique

Après leur interaction avec le stroma, les cellules épithéliales de la tumeur primaire mammaire vont franchir la membrane basale, subir l'EMT et devenir mésenchymateuses. Les cellules mésenchymateuses nouvellement transformées permettent l'invasion locale et l'intravasation via les vaisseaux environnants. Ceci permet la circulation des cellules tumorales. Les cellules tumorales circulantes vont s'extravaser dans les tissus des organes environnants. Le microenvironnement de l'organe distant se caractérise par un stroma normal et ne possède pas des signaux induisant l'EMT. Le nouveau micro-environnement permet alors aux cellules tumorales de subir une MET afin de former une métastase. (D'après Drabsch Y et Ten Dijke P, J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011).

I.3 Les programmes responsables de l'EMT

L'EMT peut être induite en réponse aux différents stimuli extracellulaires, ces derniers agiront séparément ou d'une manière coordonnée pour déclencher le processus.

Les voies de signalisation qui peuvent réguler l'EMT sont nombreuses, impliquant l'activité de différents membres de la superfamille du TGF- β , Wnts, Notch, EGF, FGF, HIF et d'autres (De Craene et al., 2005; Thiery and Sleeman, 2006) (**Figure 8**).

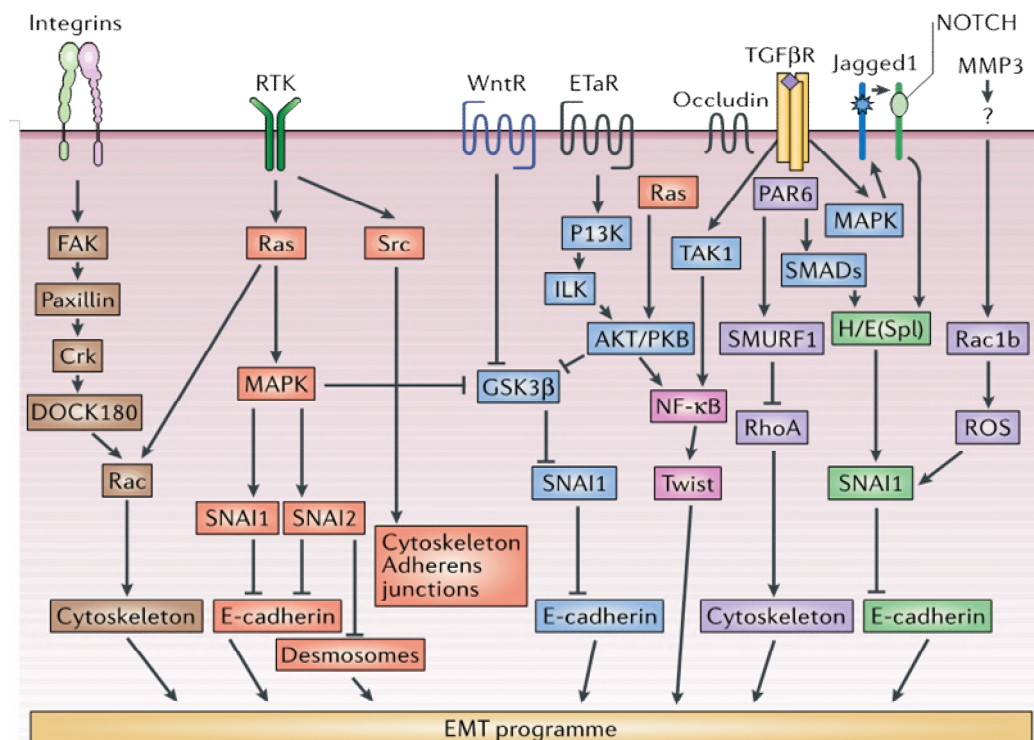


Figure 8: Complexité des voies de signalisation régulant l'EMT

Les voies de signalisation activées par les régulateurs de l'EMT et leurs interactions. L'activation des récepteurs Tyrosine Kinase (RTK) est capable d'induire l'EMT dans plusieurs contextes cellulaires et in-vivo. Mais à l'heure actuelle, il est admis que le processus de l'EMT nécessite également la co-activation des récepteurs aux intégrines. Le rôle de la voie de signalisation TGF-beta dans l'EMT est illustré avec également la régulation mutuelle de cette voie et de la voie NOTCH durant le processus de l'EMT. D'autres voies de signalisation pourraient jouer un rôle important dans EMT, incluant les récepteurs aux protéines G-couplées. Les métalloprotéines matricielles (MMPs) pourraient également déclencher le processus de l'EMT via des récepteurs encore méconnus. ETaR, endothelin-A receptor; FAK, focal adhesion kinase; GSK3β, glycogen-synthase kinase-3β; H/E(Spl), hairy/ enhancer of split; ILK, integrin-linked kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF-κB, nuclear factor-κB; PAR6, partitioning-defective protein-6; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKB, protein kinase-B; ROS, reactive oxygen species; TAK1, TGFβ- activated kinase-1; TGFβR, TGFβ receptor; WntR, Wnt receptor. (D'après Thiery JP et Sleeman J, Molecular Cell Biol, 2006).

Ces voies de signalisation peuvent coopérer pour induire une EMT complète. Ensuite, le maintien du phénotype mésenchymateux est assuré par l'activation des mêmes signaux de façon autocrine. L'activation de ces signaux est essentielle pour maintenir l'expression des facteurs de transcription inducteurs de l'EMT (Scheel and Weinberg, 2011). Les mécanismes qui contrôlent l'activité de ces inducteurs et qui fonctionnent en aval de la transcription représentent une partie très importante concernant la régulation de l'EMT dans le cancer. C'est l'objet de la partie suivante.

I.3.1 La perte de l'expression de la E-Cadhérine: rôle des facteurs de transcription inducteurs de l'EMT

La perte de l'expression de la molécule d'adhésion, la E-Cadhérine, est une étape cruciale pendant le processus de l'EMT. Des études ont découvert un certain nombre d'inducteurs de l'EMT suite à la répression de la transcription du gène codant pour la E-Cadhérine (CDH1). Les protéines en doigt de zinc Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), Zeb1 (ZEB1) et Zeb2 (ZEB2) répriment directement l'expression de la E-Cadhérine en se liant sur les boîtes CANNTG situées au niveau du promoteur du CDH1 (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Hajra et al., 2002; Eger et al., 2005; Comijn et al., 2001), tandis que les protéines en hélice-boucle-hélice comme E12/E47 (TCF3) et TWIST1 répriment l'expression de la E-Cadhérine indirectement (Perez-Moreno et al., 2001; Vesuna et al., 2008). Un certain nombre d'autres facteurs de transcription induit la relocalisation de la E-Cadhérine dans le noyau, y compris SIX1, Goosecoid (CGC) et Forkhead box C2 (FOXC2) (Micalizzi et al., 2009; Hartwell et al., 2006; Mani et al., 2007).

D'une manière intéressante, certaines études ont démontré que la perte de l'expression de la E-Cadhérine est capable à elle seule d'induire une EMT complète (Onder et al., 2008). Ceci met en évidence l'importance que représentent les répresseurs transcriptionnels du CDH1 durant le processus de l'EMT.

En effet, l'analyse des patients atteints de cancer du sein E-Cadhérine négatif, a associé l'expression de Snail à la récurrence de la tumeur, tandis que l'expression de Slug, elle a été associée à la récurrence de la tumeur et aux métastases (Moody et al., 2005; Martin et al., 2005). Quant aux répresseurs Zeb1 et Twist1, leur expression a été corrélée à une faible survie des patients atteints de cancer du sein (Soini et al., 2011; Peinado et al., 2007).

I.3.1.1 Les mécanismes de répression de la E-Cadhérine

A l'heure actuelle, les mécanismes via lesquels les différents facteurs de transcription répriment l'expression du gène codant pour la E-Cadhérine (CDH1) sont faiblement caractérisés (**Figure 9**).

En effet, le facteur de transcription Snail se lie à des séquences consensus E-box sur le promoteur de la E-cadhérine suite à des modifications locales de la structure de la chromatine après recrutement de SIN3A, des histones déacétylases (HDAC1 et HDAC2) et des composantes du complexe Poly-Comb 2 (Cano et al., 2000; Batlle et al., 2000; Fraga et al., 2004; Herranz et al., 2008) (**Figure 9 a et b**). Cependant, d'autres études ont découverts d'autres co-répresseurs qui peuvent également réguler l'activité de la protéine Snail. Parmi ces co-répresseurs on distingue CTBP1 (C-terminal binding protein) (Hemavathy et al., 2000) (**Figure 9 a et b**).

La modification de la structure de la chromatine reste l'événement régulateur majeur dirigé par ces régulateurs durant le processus de l'EMT (Peinado et al., 2005; Peinado et al., 2004).

En ce qui concerne le facteur de transcription Slug, il réprime également l'expression de CDH1 en coopérant avec CTBP1, CTBP2, HDAC1 et HDAC3 via un mécanisme qui reste à élucider (**Figure 9 b**). Cette interaction semble être indirecte étant donné que la séquence de liaison de la CTBP n'est pas conservée sur le gène Slug chez les vertébrés (Hemavathy et al., 2000).

Des études sur plusieurs lignées tumorales démontrent que les complexes co-répresseurs CTBP peuvent également intervenir lors de la répression du gène CDH1 par Zeb1 et Zeb2 (Shi et al., 2003). Les niveaux d'expression du complexe CTBP et du co-régulateur p300 semblent être cruciaux dans le contrôle de l'expression du CDH1 dans les tumeurs colorectales. Cette importance est due à la régulation de l'activité de Zeb1 via ces complexes (Pena et al., 2006). De plus, comme cela a déjà été démontré dans des cellules de mammifères, concernant les facteurs de transcription Zeb, l'activité du complexe co-répresseur CTBP peut être modifiée suite à son interaction avec d'autres co-facteurs comme le PNN. Ce dernier facilite la répression du CDH1 médiée par le complexe CTBP1 (Postigo et al., 2003) (**Figure 9 c**).

L'acétylation des protéines est capable de moduler l'efficacité avec laquelle le complexe CTBP réprime l'expression du CDH1. En effet, ces modifications altèrent à la fois la localisation nucléaire ainsi que l'interaction de CTBP avec Zeb2 (Long et al., 2005; Zhao et al., 2006) (**Figure 9c**). De plus, l'activité du complexe CTBP est régulée par le niveau d'expression de NADH (Zhang et al., 2002).

En ce qui concerne le mécanisme de répression du CDH1 par Twist, jusqu'à présent, ce mécanisme demeure largement méconnu (**Figure 9d**).

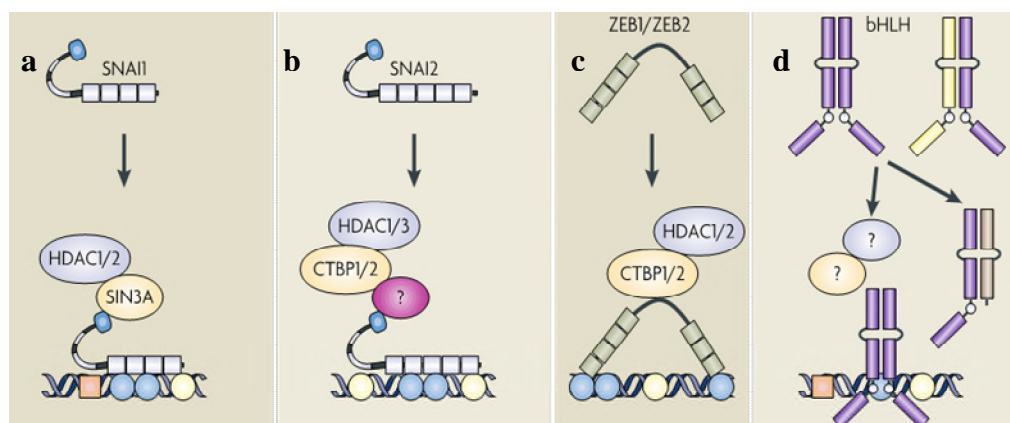


Figure 9: Vue schématique du mécanisme de répression du gène codant pour la E-Cadhérine (CDH1) par les facteurs de transcription inducteurs de l'EMT (Adapté de Peinado H et al., Nature, 2007).

Le fait que Snail, Slug, Zeb1 et Zeb2 recrutent les complexes spécifiques du remodelage de la chromatine supporte le lien entre la répression de la transcription et l'épigénétique de l'inhibition du gène CDH1 au cours de l'EMT (Peinado et al., 2005).

En plus d'être étroitement régulés au niveau transcriptionnel, les facteurs de transcription de la famille Snail subissent des modifications post-traductionnelles qui contrôlent leur localisation nucléaire ou leur dégradation. Ces modifications nécessitent la phosphorylation par PAK et GSK3 β , la déphosphorylation par le C terminal domain phosphatase (SCP) ainsi que l'oxydation de la lysine par LOXL2 (**Figure 10**) (Peinado et al., 2007; Wu and Bonavida, 2009).

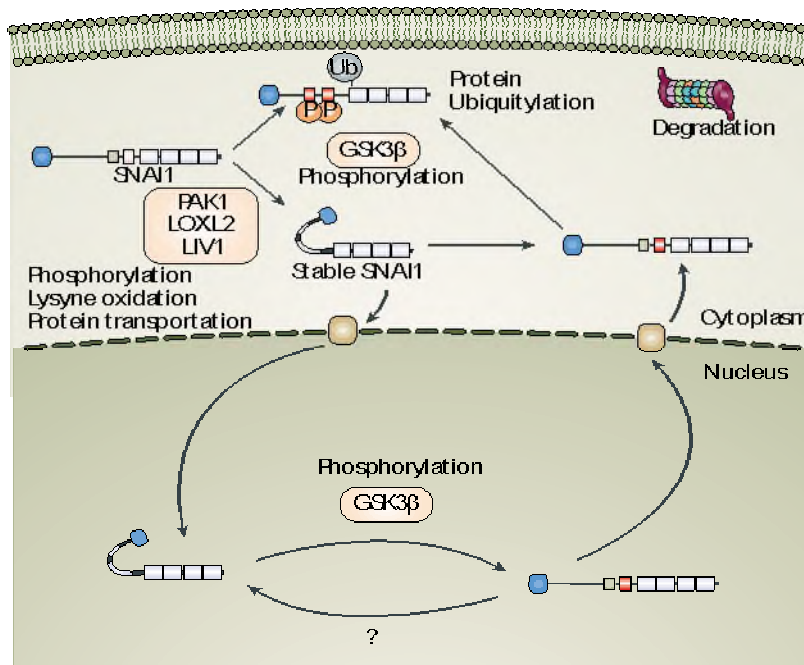


Figure 10: Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de Snail

La stabilité de Snail et sa translocation nucléaire sont positivement régulées par PAK1 (p21-activated kinase 1), LIV1 ou LOXL2. La phosphorylation de GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) favorise le transport de Snail et sa dégradation par le protéasome. (Adapté de Peinado H et al., Nature, 2007).

La stabilisation de la protéine Snail1 est favorisée par NF- κ B, ce qui empêche sa phosphorylation par GSK-3 β et la dégradation qui s'en suit (Wu and Bonavida, 2009). De plus, la traduction Cap-indépendante de l'ARNm de Snail est activée par le régulateur de la transcription/traduction Snail-box binding protein 1 (YB-1), et est associée à la perte de l'expression de la E-cadhérine et à l'agressivité du cancer du sein (Evdokimova et al., 2009). L'étude de Vincent a démontré que Snail peut également se lier aux protéines Smads, qui agissent comme des corépresseurs de la E-Cadhérine durant l'induction de l'EMT via la voie TGF- β (Vincent et al., 2009).

Enfin, quel que soit le mécanisme, les répresseurs de la E-cadhérine ont un rôle inducteur d'une EMT complète dans plusieurs contextes cellulaires. Ces répresseurs régulent l'expression de nombreux gènes qui répriment le caractère épithélial afin d'induire un phénotype mésenchymateux.

De plus, ces répresseurs sont capables de réprimer la polarité épithéliale et la division cellulaire tout en favorisant la survie (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Peinado et al., 2007).

I.3.2 La perte de la polarité cellulaire

La perte de la polarité cellulaire est une étape cruciale pendant le processus de l'EMT. En effet, chez les cellules épithéliales, trois complexes protéiques participent à l'établissement et au maintien de la polarité apico-basale: PAR, Crumbs et Scribb. Les composantes de ces trois complexes sont régulées par des inducteurs de l'EMT (Moreno-Bueno et al., 2008). En effet, Snail altère la polarité épithéliale via la répression de la transcription de Crumbs3 et le blocage de la localisation des complexes PAR et Crumbs au niveau des jonctions (Whiteman et al., 2008). De même, Zeb1 réprime directement la transcription des gènes de la polarité cellulaire y compris Crumbs3, PATJ (Pals1-associated tight junction proteins) et Lgl2 (Lethal giant larvae) (Spaderna et al., 2008).

De plus, le TGF- β peut également contribuer à la perte de la polarité cellulaire pendant l'EMT de deux manières: soit à travers la voie canonique en induisant l'expression de Snail et Zeb, soit via la voie non-canonique qui comprend la régulation négative de l'expression de PAR3, la dégradation de RhoA et l'altération locale du cytosquelette d'actine médiée par la protéine PAR6 (Ozdamar et al., 2005; Wang et al., 2008).

I.3.3 Les protéases et le réseau de la Matrice Extracellulaire

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) sont des protéines sécrétées par les cellules tumorales et sont capables de dégrader la membrane basale, facilitant ainsi la sortie des cellules de la matrice extracellulaire et leur migration au cours de l'EMT.

Les facteurs de transcription inducteurs de l'EMT tels que Snail, Slug, Twist et Zeb1 sont capables d'induire l'expression des MMPs (**Tableau 1**). Néanmoins, certaines protéases sont capables à elles seules de déclencher le processus de l'EMT. A titre d'exemple, la MMP3 déclenche l'EMT en augmentant le niveau d'expression de ROS (Reactive Oxygen Species), qui à son tour induit l'expression de Snail et par conséquent l'EMT (Radisky et al., 2005). L'Epilysin (MMP-28) est un membre des enzymes des métalloprotéinases matricielles récemment découvert. Il est capable d'induire l'EMT via l'activation du TGF- β (Illman et al., 2006). Enfin, la Periostin, une protéine de la matrice extracellulaire sécrétée par les ostéoblastes interagit avec les intégrines pour induire des signaux principalement via la voie PI3-K/Akt et par conséquent l'EMT (Ruan et al., 2009).

Tableau 1: L'expression des métalloprotéases matricielles et leur régulation dans des modèles d'EMT in-vitro. (Adapté de Gilles C et al., Madame Curie Bioscience Database, 2004).

Origin of the Cell Line	Inducer of the EMT/Comparison of Different with lines with Different Invasive Degrees	EMT Traits	MMP Expressed in EMT
Rat bladder carcinoma NBT-II cells	Numerous inducers(bFGF, HGF, collagens,...)	Cell scattering, reorganization of E-cadherin	MMP-2
Madin Darby canine kidney(MDCK)	Numerous inducers (bFGF, HGF, oncogenes,...)	Cell scattering, reorganization of E-cadherin, tube formation in collagen gels	MT1-MMP
Human breast cancer cell lines	Comparison	Loss of E-cadherin, vimentin expression, invasiveness	MT1-MMP MMP-2 activation
Human breast MCF10A cells	Oncogenes (v-Ha-ras and erbB2)	Loss of E-cadherin, vimentin expression, invasiveness	MMP-2
Human MCF10A breast cells line	Wound assay	E-cadherin reorganization, vimentin expression, migration	MT1-MMP
Mouse mammary SpC-2 cells	MMP-3	Loss of E-cadherin, vimentin expression, invasiveness	MMP3, MMP9, MMP-13
Mouse mammary NMuMG cells	TGF- β	Transformation of extremely spindle morphology from cobblestone appearance, branching tubules in 3D collagen gels	MT1-MMP Sato, unpublished data
Mouse mammary tumour cell lines	Comparison	vimentin expression, invasiveness	MMP-2 activation
Rat mammary carcinoma cells lines	Comparison	Epithelial (E) and Mesenchymal (M) variants of the same tumour based on morphology	MMP-3, MMP-9, MMP-13
Human bronchial cell lines	Comparison	Lack of E-cadherin, vimentin expression, invasiveness	MMP-2, MT1-MMP
Human bronchial epithelial cell	Wound assay	Vimentin expression, migration	MMP-9, MMP-3, MMP-11
Human prostate cancer cell lines	Comparison	Lack of E-cadherin, vimentin expression, invasiveness	MMT-MMP Williams & Thompson, unpublished, also
Human cervical cell lines	Human Papillomavirus 33+ Ha-ras	Lack of E-cadherin, vimentin expression, invasiveness	MT1-MMP, MMP-2 activation
Squamous cell carcinoma A431	snail	Lack of E-cadherin, vimentin expression	MMP-2

I.4 Le rôle des miRNAs dans la régulation de l'EMT

Les microARNs sont des simples brins non codants de 22 nucléotides qui ont comme fonction la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes en couplant les séquences 2-8 nucléotides à l'extrémité 5' à des séquences complémentaires dans la région 3', non traduite, de l'ARNm cible. Cette association se traduit par la dégradation de l'ARNm cible et/ou l'inhibition de sa traduction.

Des études récentes ont mis en évidence l'importance des micro-ARNs dans la régulation du phénotype épithélial en contrôlant les inducteurs de l'EMT. De nombreux travaux ont démontré que les microARNs de la famille miR-200 peuvent contrôler l'EMT via la régulation négative de l'expression de Zeb (Christoffersen et al., 2007; Hurteau et al., 2007; Gregory et al., 2008; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008). En effet, la surexpression des membres de la famille du miR-200 inhibe la capacité des lignées cellulaires d'adénocarcinome du poumon à accomplir l'EMT, à envahir et à métastaser (Gibbons et al., 2009). Outre les membres de la famille miR-200, la perte de l'expression des miR-10b, miR-373 et miR-520c a également été présentée comme étant impliquée dans la progression du cancer du sein (Ma and Weinberg, 2008). Ainsi, une cascade de régulation impliquant les mi-RNAs et les régulateurs transcriptionnels de l'EMT est susceptible de contribuer de manière

significative à la progression du carcinome. Cette hypothèse a été récemment validée sur Zeb1. En effet, ce dernier peut se lier au promoteur des miR-141 et miR-200c pour ainsi réprimer leur expression, générant ainsi une boucle de régulation qui peut renforcer la capacité de Zeb1 à maintenir un phénotype mésenchymateux stable (Burk et al., 2008) (**Figure 11**).

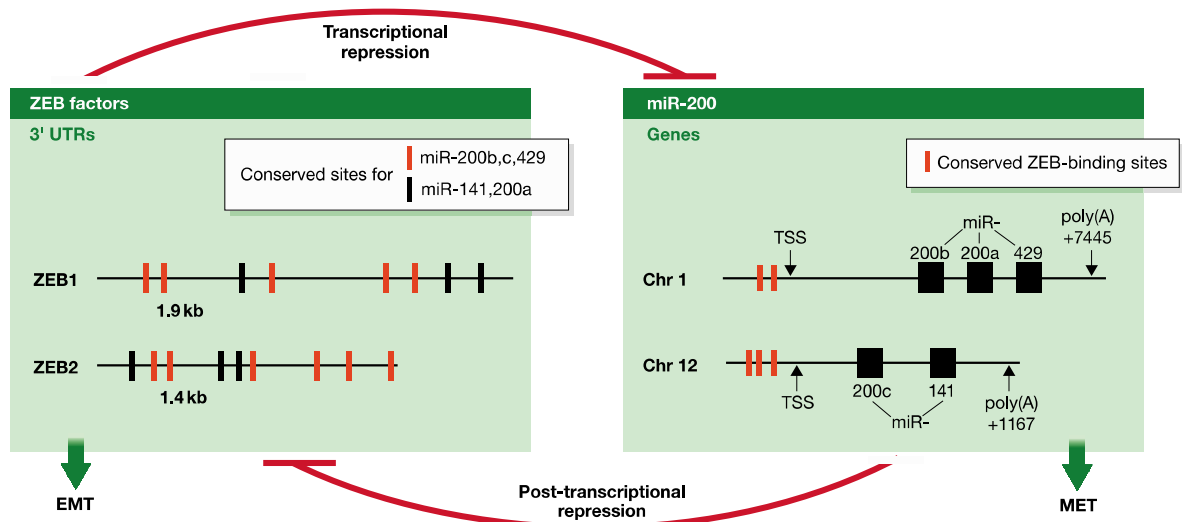


Figure 11: La boucle de régulation rétroactive de ZEB/miR-200

Les facteurs de transcription Zeb répriment les gènes de la famille des miR-200 en se liant sur des séquences de reconnaissance hautement conservées au niveau de leurs promoteurs. Les membres de la famille miR-200 inhibent l'expression de Zeb au niveau post-transcriptionnel en se liant à des sites cibles hautement conservés au niveau de leurs 3' UTRs. Chr: chromosome; TSS: Transcriptional Start Site; UTR: Untranslated Region. (D'après Brabletz S et Brabletz T, EMBO Reports, 2010).

I.5 L'EMT induit une résistance à l'apoptose et à la sénescence

La première étude démontrant un lien entre l'EMT et la résistance à l'apoptose a été publiée en 2002 (Valdes et al., 2002). Cette étude a démontré le rôle de l'EMT induit par le TGF- β dans l'induction d'une résistance à l'apoptose. Plus tard, ceci a été confirmé par de nombreuses autres études dans différents modèles cellulaires. À titre d'exemple, une étude a démontré que l'exposition des cellules tumorales de cancer du sein (NMuMG) au TGF- β pendant plusieurs semaines génère des cellules qui échappent à l'apoptose et qui se caractérisent par un phénotype mésenchymateux très prononcé (Gal et al., 2008). Une autre étude du Dr. Puisieux A. a établi que Twist est capable d'inhiber l'effet pro-apoptotique de Myc dans les neuroblastomes (Puisieux et al., 2006).

Le processus de l'EMT peut également conférer une résistance à la sénescence. En effet, Twist1 et Twist2 empêchent les cellules d'entrer en sénescence. Ceci en inhibant p16/ink4a et p21/cip (Ansieau et al., 2008). De plus, les protéines Twist coopèrent avec l'un des régulateurs de la sénescence, Ras,

de façon concomitante afin de déclencher une EMT complète et pour favoriser l'invasion. Ces travaux suggèrent que l'inhibition de la sénescence pourrait être un mécanisme associé à l'EMT.

Ainsi, l'expression constitutive des inducteurs de l'EMT peut maintenir le phénotype mésenchymateux et invasif tout en assurant la survie des cellules micrométastatiques en supprimant deux mécanismes de sauvegarde contre le cancer: la sénescence et l'apoptose.

I.6 Le rôle de l'EMT dans l'induction des propriétés de cellules souches cancéreuses

Les cellules souches mammaires normales (MASCs) possèdent des propriétés d'auto-renouvellement et de pluripotence. Ceci a été démontré *in-vivo* via la formation d'une glande mammaire fonctionnelle à partir d'une seule cellule souche mammaire (Shackleton et al., 2006). Dans le cas d'une cellule tumorale, ces caractéristiques lui donneront la capacité de coloniser un site secondaire. En effet, la colonisation de sites secondaires implique l'expansion des cellules cancéreuses contenant une cellule souche-like afin de construire une niche pour la nouvelle tumeur.

Des études sur les cellules tumorales mammaires isolées ont démontré leur capacité à former des mammosphères et possèdent un profil $CD44^+/CD24^-$ (Ponti et al., 2005). La population de cellule possédant ce profil augmente la capacité d'initiation de tumeurs *in-vivo* (Al-Hajj et al., 2003). Ainsi, une sous-population de cellules tumorales de cancer du sein possède des propriétés d'auto-renouvellement similaires à celles des cellules souches mammaires normales (MASCs). Par conséquent, ces cellules ont été nommées les cellules souches cancéreuses (CSCs).

En raison de l'implication de l'EMT et des cellules souches cancéreuses dans la formation des métastases, l'hypothèse de l'existence d'un éventuel lien entre l'EMT et les cellules souches cancéreuses a été émise. En effet, deux groupes de chercheurs ont démontré que la population $CD44^{high}/CD24^{low}$ de cellules normales et transformées possède un phénotype associé à l'EMT en comparaison avec la population $CD44^{low}/CD24^{high}$ (Morel et al., 2008; Mani et al., 2008).

De manière intéressante, certaines études ont démontré que l'induction de l'EMT via Twist1, Snail ou TGF- β 1, induit une augmentation de la population $CD44^{high}/CD24^{low}$ et la fréquence de l'initiation de la tumeur (Morel et al., 2008; Mani et al., 2008). Ainsi, le rôle des inducteurs de l'EMT dans l'induction des cellules souches cancéreuses est démontré. De plus, plusieurs études ont montré une augmentation des caractéristiques de cellules souches cancéreuses du cancer du sein par l'intermédiaire de SIX1, Slug, Twist2, FOXQ1, le TNF et TP53 (McCoy et al., 2009; Farabaugh et al., 2012; Bhat-Nakshatri et al., 2010; Fang et al., 2011; Qiao et al., 2011; Asiedu et al., 2011; Chang et al., 2011).

L'analyse des échantillons de biopsies de cancer du sein a renforcé le lien entre l'EMT et l'acquisition des propriétés de cellules souches cancéreuses. En effet, une corrélation entre le sous type de cancer du sein claudine-low et les marqueurs de l'EMT et de cellules souches cancéreuses a été réalisée (Prat et al., 2010). De façon intéressante, ce groupe a démontré que la famille des miR-200 est régulée négativement dans ces tumeurs (Herschkowitz et al., 2012) sachant que d'autres groupes ont démontrés que cette famille de miRNA est capable de cibler les gènes BMI1 (Shimono et al., 2009) et SUZ12 (Iliopoulos et al., 2010) qui jouent un rôle dans l'induction des capacités d'auto-renouvellement (Iliopoulos et al., 2010; Liu and Wicha, 2010).

Enfin, l'ensemble de ces études montre clairement le lien existant entre l'EMT et l'induction de propriétés de cellules souches cancéreuses.

I.7 Le rôle de l'hypoxie dans l'induction de l'EMT

Le microenvironnement hypoxique joue un rôle essentiel dans la progression tumorale. Les effets de l'hypoxie sont principalement médiés par des facteurs HIFs (Hypoxia Inducible Factors). L'induction de l'EMT a été démontrée dans différentes lignées cellulaires après leur mise en condition hypoxique (1% O₂) ou après une expression constitutive de HIF (Zhou et al., 2009; Giannoni et al., 2012). En effet, sous les conditions d'hypoxie, le microenvironnement tumoral active les principales voies de signalisation déclenchant l'EMT afin d'induire la croissance tumorale et les métastases. Parmi ces voies de signalisation, on distingue la voie TGF- β , Notch et NF-kB (Jiang et al., 2011). De plus, il est de plus en plus admis que HIF module l'EMT en régulant l'expression et l'activité des principaux facteurs de transcription inducteurs de l'EMT et plus spécifiquement Twist. En effet, Dr. Yang et collaborateurs ont montré que la diminution de l'expression de HIF-1 α dans des cellules tumorales en hypoxie reverse le niveau d'expression de Twist pour revenir à un état pré-hypoxique, indiquant que HIF-1 α est le principal régulateur de l'expression de Twist dans les cellules hypoxiques (Yang et al., 2008; Yang et al., 2006a).

Le lien entre l'hypoxie et les facteurs de transcription inducteurs de l'EMT, essentiellement Twist, suggère que l'EMT pourrait être un mécanisme expliquant l'association entre l'hypoxie et les métastases tumorales.

I.8 L'EMT induit une résistance à la chimiothérapie

Une étude a démontré que les tumeurs subissant l'EMT peuvent résister à la chimiothérapie conventionnelle. En effet, des cellules tumorales du côlon rendues résistantes à l'oxaliplatine, présentent un phénotype mésenchymateux et expriment plusieurs marqueurs de l'EMT (Yang et al., 2006b). Une autre étude plus récente a montré que la résistance des lignées cellulaires épithéliales du carcinome de l'ovaire au paclitaxel est également associée à l'acquisition des marqueurs mésenchymateux et à la perte du phénotype épithélial (Kajiyama et al., 2007). En outre, l'inhibition de Twist peut reverser partiellement la résistance aux différentes drogues dans les cellules du cancer du sein (Li et al., 2009). De même, Snail confère une résistance au paclitaxel, à l'adriamycine en antagonisant l'induction de l'apoptose via p53 (Kajita et al., 2004; Kurrey et al., 2009). Enfin, une étude récente a démontré que l'induction de l'expression du régulateur négatif de l'EMT (miR-200c) est capable de restaurer la sensibilité à la chimiothérapie (Cochrane et al., 2009).

L'ensemble de ces études élucide le rôle de l'EMT dans l'induction de la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie.

I.9 Le rôle de l'EMT dans la réponse immunitaire anti-tumorale

Les tumeurs peuvent échapper à la surveillance immunitaire en induisant une tolérance ou en modifiant leur phénotype à travers l'immunoediting.

Les études concernant la relation entre l'EMT et la résistance au système immunitaire sont très rares. Avant la publication de mes travaux de thèse, seulement deux études décrivaient ce lien. La première étude a été publiée en 2006, et a démontré que les tumeurs Her2/neu-positives échappant à la surveillance immunitaire ont subi l'EMT (Knutson et al., 2006). La deuxième étude du Dr. Kudo S. a établi que Snail est associé à l'activation de cytokines immunosuppressives, des cellules T régulatrices et à la génération de cellules dendritiques inefficaces (Kudo-Saito et al., 2009). Enfin, la troisième étude montrant le lien entre l'EMT et la réponse immunitaire anti-tumorale concerne mes travaux de thèse dont les résultats sont détaillés dans la partie résultats de ce manuscrit. En effet, mes travaux montrent que l'EMT est capable d'induire une diminution de la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse spécifique. Ceci implique soit l'induction de l'autophagie dans un modèle de lignée tumorale MCF7 transfectée avec des facteurs de transcription inducteurs de l'EMT ou traitées avec le TNF- α (**Figure 12**) (Akalay et al., 2013a; Akalay et al., 2013b), soit l'induction de la voie TGF- β dans un modèle de lignée tumorale MCF7-WISP2/CCN5 déficiente (Akalay I et al., submitted).

L'ensemble de ces études montrent que l'EMT est donc capable d'accélérer les métastases tumorales, non seulement en augmentant l'invasion, mais également en induisant une résistance au système immunitaire.

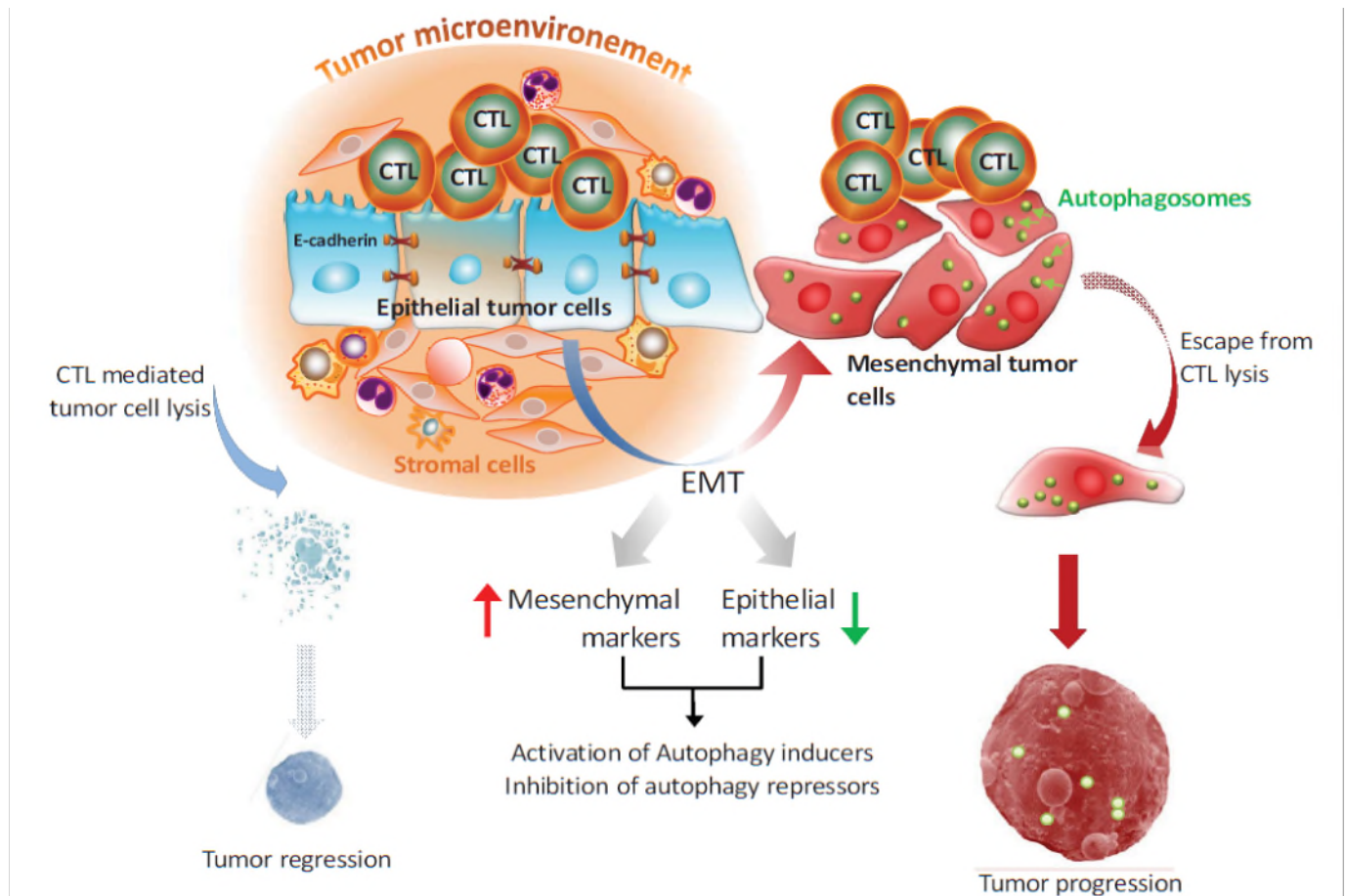


Figure 12: L'acquisition du phénotype mésenchymateux induit une diminution de la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques via l'induction de l'autophagie (Akalay I et al., Autophagy, 2013)

I.10 Les thérapies anticancéreuses ciblant l'EMT

Les traitements anticancéreux classiques ne sont pas efficaces contre les cellules souches cancéreuses. Ces dernières sont beaucoup plus résistantes que la majeure partie des cellules épithéliales qui ne possèdent pas de propriétés de cellules souches cancéreuses.

En effet, après la thérapie, les cellules tumorales mammaires résiduelles affichent à la fois des caractéristiques mésenchymateuses et initiatrices de tumeurs (Creighton et al., 2009). En outre, certaines thérapies initialement conçues pour prévenir la croissance tumorale et la dissémination se sont avérées limitées. Les exemples incluent les inhibiteurs de l'angiogenèse ainsi que les inhibiteurs de PARP-1. Ces derniers ont été utilisés seuls ou en combinaisons avec la chimiothérapie et

radiothérapie. Mais les chercheurs ont découvert qu'ils pouvaient promouvoir l'EMT suite à la régulation de la voie de signalisation TGF- β via PARP-1 (Lonn et al., 2010). Néanmoins, récemment, Dr. Rodriguez et collaborateurs ont suggéré que PARP-1 peut stabiliser la protéine Snail, suggérant à nouveau l'intérêt de son inhibition dans les traitements. D'après ces études, il est clair que les molécules qui exercent de multiples rôles dans les mêmes voies de signalisation et dont l'expression est contexte cellulaire-dépendante ne doivent pas être la cible des traitements anti-cancéreux. Par conséquent, des efforts sont actuellement consacrés à la conception de thérapies spécifiques pour cibler à la fois l'EMT et les cellules souches cancéreuses (Alison et al., 2011).

En ce qui concerne l'EMT, la stratégie privilégiée a été le ciblage des voies de récepteurs à Tyrosine Kinase (EGFR, ErbB, PDGFR, etc) en utilisant des antagonistes des récepteurs ou des inhibiteurs sous forme d'anticorps ou de petites molécules (Chua et al., 2012). La voie de signalisation TGF- β a également été une cible d'inhibition via l'utilisation des mêmes stratégies. Ainsi, des anticorps neutralisants contre le TGF- β sont en essai clinique de phase 1 (Chua et al., 2012).

Afin de cibler les cellules souches cancéreuses, les stratégies utilisées comprennent Notch, Wnt et Shh et les stratégies de criblage à haut débit. Ces derniers ont déjà produit des résultats tels que la salinomycine. Cette dernière a récemment été identifiée à partir d'une bibliothèque composée de 16.000 petites molécules sur la base de sa cytotoxicité sélective vers les cellules mammaires enrichies en cellules souches cancéreuses. Cette étude fournit la preuve que les cellules souches cancéreuses présentant des caractéristiques mésenchymateuses peuvent être sélectivement ciblées (Gupta et al., 2009).

La caractérisation des voies de signalisation majoritairement activées dans les cellules souches cancéreuses permettra la découverte de cibles plus efficaces pour les éliminer. A titre d'exemple, la voie de signalisation JAK2/Stat3 est spécifiquement nécessaire pour la croissance des populations de cellules souches cancéreuses dans le cancer du sein (Marotta et al., 2011). En outre, de nouvelles stratégies sont développées afin de cibler les enzymes cytoprotectrices telles que l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) ou les pompes à efflux de médicaments telles que les transporteurs ABC (Alison et al., 2011).

La possibilité d'utiliser des biopsies de patients ouvre la possibilité d'évaluer l'efficacité de différentes thérapies *in-vitro*, de prévoir ainsi les réponses de ces patients aux traitements et de designer des stratégies thérapeutiques personnalisées (Anido et al., 2010). En outre, lorsque ces biopsies sont testées sur des modèles métastatiques de souris en combinaison avec des gènes rapporteurs ainsi que des techniques d'imagerie, une meilleure compréhension de la biologie des

processus activés dans ces tumeurs et une meilleure évaluation des stratégies thérapeutiques s'offrent aux spécialistes (Liu and Wicha, 2010).

La question qui se pose en permanence quant aux thérapies anti-cancéreuse est la spécificité des inhibiteurs et des petites molécules utilisés. Cela est particulièrement important lorsque l'on cible les voies de signalisation pléiotropiques ou bien qui jouent des rôles à la fois bénéfiques et néfastes comme le TGF- β ou l'hypoxie. À cet égard, le ciblage des facteurs de transcription qui déclenchent le processus de l'EMT pourrait être avantageux, principalement parce qu'ils sont très faiblement exprimés voire non-exprimés dans les tissus adultes normaux. Néanmoins, les facteurs de transcription sont difficiles à cibler avec des approches classiques. Les microARN et les ARN interférents sont faciles à concevoir et offrirait une bonne spécificité. Malgré l'instabilité de ces ARNs, plusieurs études ont démontré une inhibition de la tumorigenèse et des métastases dans des modèles de souris en administrant des miRNAs et des siRNA-aptamer (Dassie et al., 2009; Kota et al., 2009; Ma et al., 2010).

En termes de plasticité, l'EMT et les cellules souches cancéreuses représentent une limitation qui pourrait survenir dans les thérapies ciblant les cellules souches cancéreuses. Ceci provient de la récente découverte qui a démontré que les cellules épithéliales mammaires normales et transformées peuvent être converties en cellules souches et en cellules souches cancéreuses respectivement (Chaffer et al., 2011). Ainsi, de nouvelles cellules souches peuvent être générées malgré l'éventuelle inhibition des cellules souches préexistantes. Par conséquent, les stratégies de ciblage des cellules souches cancéreuses uniquement peuvent ne pas être efficaces pour le traitement. En outre, bien que l'EMT soit cruciale pour la dissémination de la tumeur et l'échappement aux mécanismes de sauvegarde cellulaires, les cellules tumorales reviennent au phénotype épithéliale via le processus de la MET afin de coloniser les nouveaux sites distants et de former des métastases. L'EMT dans le cancer est un événement transitoire, indiquant que l'invasion et les métastases sont deux processus indépendants qui impliquent probablement différents réseaux de gènes. Par conséquent, les stratégies ciblant l'EMT peuvent être efficaces pour le traitement des tumeurs primaires, tout en étant cependant préjudiciables quant à la prévention des métastases. Néanmoins, les thérapies combinées ainsi que le progrès au niveau de la dissection des mécanismes de la plasticité cellulaire et l'interaction des cellules tumorales avec la niche métastatique seront cruciales pour concevoir des traitements plus efficaces.

Chapitre II



II. L'autophagie

II.1 Définition

Dans les années 1960, le processus de l'autophagie a été décrit pour la première fois en tant que processus d'auto-digestion. Actuellement, il est évident que l'autophagie est un processus catabolique impliquant la dégradation des composants d'une cellule par l'organisme lysosomal. Il s'agit d'un processus hautement régulé qui joue un rôle important dans la croissance cellulaire, le développement et l'homéostasie tout en aidant à maintenir un équilibre entre la synthèse, la dégradation et le recyclage ultérieur des produits cellulaires (Mizushima et al., 2008).

Trois types d'autophagie existent chez les eukaryotes:

- Microautophagie,
- Macroautophagie,
- Chaperone-Mediated Autophagy (CMA).

Elles sont différentes au niveau de leur mécanisme de transport du contenu cytoplasmique vers les lysosomes (Klionsky, 2005) (**Figure 13**).

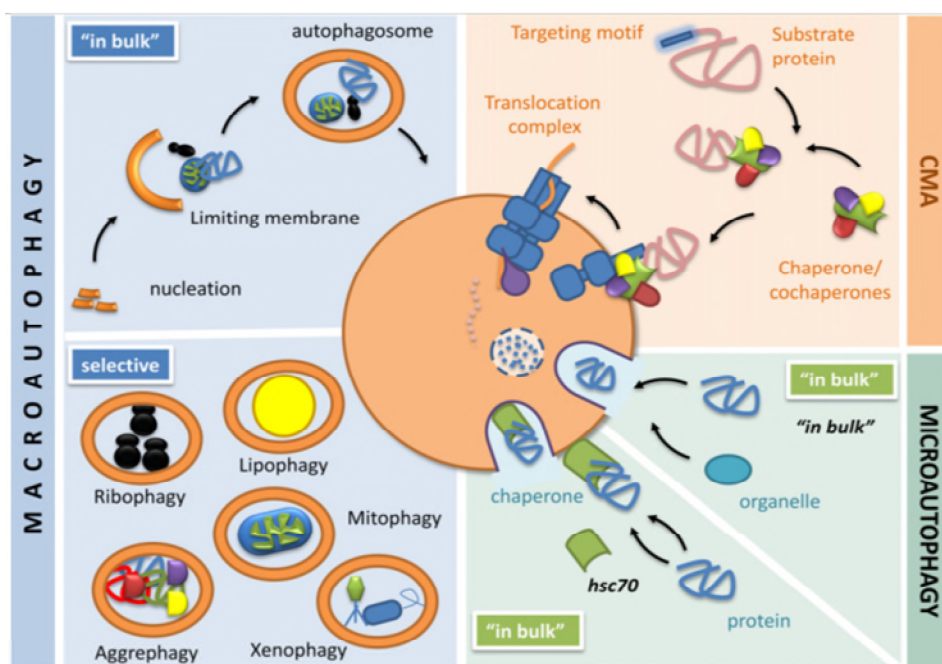


Figure 13: Les différents types d'autophagie dans les cellules mammifères

Trois types d'autophagie co-existent dans toutes les cellules mammifères. La macroautophagie implique la séquestration des régions du cytosol à l'intérieur des vésicules à double membrane. Ces régions deviennent des compartiments de dégradation lors de la fusion avec les lysosomes. Des exemples spécifiques de macroautophagie sélective sont élucidés à gauche. La microautophagie se produit lorsque les composants cytosoliques sont directement engloutis par les lysosomes via les invaginations de la membrane lysosomale. La CMA (Chaperon Mediated Autophagy), initiée via la reconnaissance par un chaperon d'un motif de ciblage sur la protéine cytosolique pour la dégradation. Le complexe chaperon/substrat atteint ensuite la surface du lysosome et le substrat est ensuite internalisé au niveau de la membrane lysosomale par l'intermédiaire d'un complexe de translocation (D'après Cuervo A.M et Macian F, Molecular Aspects of Medicine, 2012).

La macroautophagie, appelée autophagie dans la suite de ce chapitre, implique la formation d'une membrane autour de la zone cible de la cellule afin de séparer le contenu cellulaire du reste du cytoplasme. La vésicule résultante fusionne ensuite avec un lysosome et dégrade par la suite le contenu de la cellule (**Figure 14**).

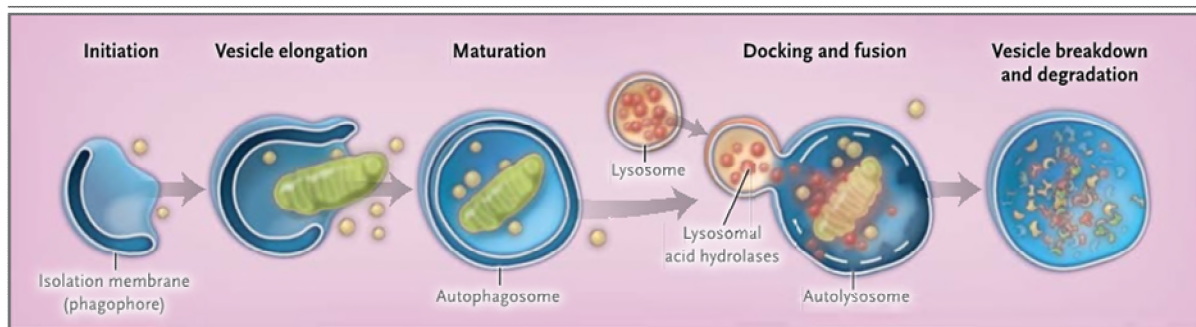


Figure 14: Les étapes du processus autophagique

Le processus autophagique est constitué de plusieurs étapes en commençant par l'étape de l'initiation (formation d'une structure preautophagosomale conduisant à une membrane d'isolement, ou phagophore), l'allongement de la vésicule, la maturation des autophagosomes et la séquestration du matériel à dégrader, et la fusion des autophagosomes aux lysosomes. Au cours de la dernière étape, le contenu autophagosomal est dégradé par les acides hydrolases lysosomiques et le contenu de l'autolysosome est ensuite libéré pour le recyclage métabolique (D'après Augustine C et al., N Engl J Med, 2013).

L'autophagie peut inhiber la progression de certaines pathologies telles que certains types de maladies neuro-dégénératives et le cancer. Néanmoins, dans certaines situations, l'autophagie participerait au développement de la maladie. En effet, son rôle dans la pathologie humaine est assez complexe.

II.2 La machinerie moléculaire du processus autophagique

Les études effectuées afin de comprendre les mécanismes qui régulent l'autophagie ont commencé par l'identification des gènes liés à l'Autophagie (ATG), initialement chez la levure (Ohsumi, 1997; Ohsumi et al., 1993). Au jour d'aujourd'hui, plus de 30 gènes ATG ont été clonés. Ainsi, les gènes ATG chez les mammifères ont été identifiés montrant une conservation élevée en comparaison avec les gènes de la levure (Klionsky et al., 2003). L'ensemble des protéines ATG est impliqué dans les différentes étapes du processus autophagique à savoir: la formation de la membrane isolante, l'immersion du cytoplasme, la formation de vésicules autophagiques, et enfin la fusion avec les lysosomes. Ces gènes représentent donc le centre de la machinerie autophagique. Un résumé du rôle des différentes protéines ATG au cours du processus autophagique est illustré dans le **Tableau 2**.

Tableau 2: Les protéines majeures régulatrices de l'autophagie dans les cellules mammifères (D'après Augustine C et al., N Engl J Med, 2013).

Autophagic Protein	Gene	Yeast Homologue	Function in Autophagic Regulation
Unc-51-like kinase 1	<i>ULK1</i>	Atg1	Interfaces with mTORC1; major initiator of the regulation of autophagy
ATG3	<i>ATG3</i>	Atg3	Ubiquitin (E2)-like enzyme; acts as ligase for ATG8 and ATG12, catalyzes the conjugation of ATG8-like proteins to phosphatidylethanolamine (PE)
ATG4B	<i>ATG4B</i>	Atg4b	ATG8 cysteine peptidase; converts pro-LC3 (ATG8) to LC3-I, delipidates autophagosomal LC3-II
ATG5	<i>ATG5</i>	Atg5	Forms a complex with ATG12; assists in autophagosomal elongation
Beclin 1	<i>BECN1</i>	Atg6/Vps30	BCL-2-binding protein; forms a regulatory complex with class III phosphatidylinositol-3-kinase (VPS34)
ATG7	<i>ATG7</i>	Atg7	E1 ubiquitin conjugase-like enzyme; facilitates conjugation of ATG8 proteins to PE, acts as an E1 enzyme for ATG12 conjugation to ATG5 and ATG3
Microtubule-associated protein 1 light chain 3B	<i>MAP1LC3B</i>	Atg8	Ubiquitin-like modifier; stably associates with autophagosomal membrane
ATG9A	<i>ATG9A</i>	Atg9	Associates with preautophagosomal structure in yeast, assists in autophagosomal assembly
ATG10	<i>ATG10</i>	Atg10	E2 ubiquitin ligase-like enzyme; catalyzes the conjugation of ATG5 and ATG12
ATG12	<i>ATG12</i>	Atg12	Forms a complex with ATG5; assists in autophagosomal elongation
ATG14L	<i>ATG14</i>	Atg14	Autophagy-specific subunit of Beclin 1-class III phosphatidylinositol complex
ATG16L1	<i>ATG16</i>	Atg16	Associates with isolation membrane in complex with ATG5-ATG12; assists in autophagosomal elongation

L'ensemble des protéines ATG essentiel à la formation des autophagosomes est composé de quatre sous-groupes (Yang and Klionsky, 2010):

- Le complexe ATG1/UNC-51-like kinase (ULK) avec les protéines ATG13 et ATG17 pour l'induction de l'autophagie,
- La classe III du complexe Phosphatidylinositol 3-kinase composé de Vps34, ATG6/Beclin 1 et ATG14 est impliquée dans la formation des autophagosomes,
- Les protéines ATG12 et ATG8/LC3 qui composent les systèmes de conjugaison impliqués dans l'expansion des membranes des autophagosomes,
- ATG9 et son complexe qui participe à la formation des membranes formant les autophagosomes,
- Et enfin un ensemble de protéines nécessaire à la fusion des autophagosomes aux lysosomes pour la dégradation du matériel séquestré.

II.2.1 Le complexe ATG1/UNC-51-like kinase (ULK)

La protéine ATG13 est l'un des cibles de la kinase TOR2 (Target Of Rapamycin 2) (Kamada et al., 2000). En effet, en présence des facteurs de croissance, la kinase TOR2 est activée. Ainsi elle phosphoryle ATG13, ce qui empêche son association à ATG1. Sous ces conditions, ATG1 contribue

à la formation de vésicules lysosomales mais pas à celle des autophagosomes (Abeliovich et al., 2003). Au cours de la privation en nutriments, TOR2 est inhibée; ceci est le résultat de l'activation des phosphatases et la déphosphorylation partielle de ATG13. ATG13 déphosphorylée s'associe donc à ATG1 et l'active. Ceci permet le recrutement de ATG17 et la formation du complexe ATG1-ATG13-ATG17. Ce dernier participe à l'élongation de la membrane d'isolement (Kim et al., 2002) (**Figure 15-étape 1**).

II.2.2 Le complexe Vps34-Beclin 1

L'implication de la PI3-kinase dans l'autophagie a été initialement établie suite à l'observation de l'inhibition de la formation des autophagosomes par des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3-K y compris la 3-méthyladénine, la wortmannine et le LY-294002 (Blommaert et al., 1997). La Vps34 phosphoryle le phosphatidylinositol (PI) afin de produire la phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), un lipide qui favorise la formation d'un complexe protéique, la fermeture de la membrane et la séquestration des composants cytoplasmiques dans les vacuoles autophagiques (Mizushima et al., 2001; Petiot et al., 2000). Par conséquent, le complexe PI3-K non seulement contrôle la nucléation des vésicules autophagiques, mais favorise également les étapes de conjugaison. En effet, Beclin-1 (ATG6) au sein de ce complexe interagit avec plusieurs partenaires, y compris Bcl-2, UVRAG, Ambra et Bif-1. Ces interactions moléculaires sont essentielles à la régulation de l'autophagie au niveau de la nucléation de la membrane isolée (Fimia et al., 2007; Pattingre et al., 2005; Takahashi et al., 2007) (**Figure 15-étape 2**).

II.2.3 Les systèmes de conjugaison ATG12/LC3 (ATG8)

Le premier système de conjugaison implique la liaison d'une molécule lipidique à la partie COOH terminale de la protéine LC3, appelée également ATG8. Dans cette étape de conjugaison, ATG7 et ATG3 agissent, respectivement, comme des homologues des enzymes E1 et E2. En effet, pour que cette conjugaison ait lieu, la protéine LC3 doit être clivée par la cystéine protéase ATG4 (Ichimura et al., 2000). Ensuite, la protéine LC3 clivée (LC3-I) est activée par ATG7 et transférée à ATG3. Ainsi, ATG3 conjugue LC3 à la phosphatidyléthanolamine (PE) afin de former la LC3-II. Cette dernière représente une forme lipidique associée aux membranes ou aux vésicules autophagiques, ce qui en fait un marqueur des autophagosomes (Kirisako et al., 1999) (**Figure 15-étape 3**).

Le deuxième système de conjugaison implique la liaison de la partie COOH terminale de ATG12 à ATG5 via le résidu lysine (Mizushima, 2007). Au cours de cette conjugaison, ATG7 et ATG10

agissent, respectivement, comme des homologues des enzymes E1 et E2. Ensuite, ATG7 hydrolyse la molécule d'ATP afin d'activer ATG12. Ainsi, ATG12 activée est transférée à ATG5 via ATG10. Enfin, le complexe ATG5-ATG12 s'associe à ATG16, qui s'oligomérisent pour former de larges unités qui sont requises pour la fixation de LC3 à la membrane et l'élongation de la membrane séquestrante (Kuma et al., 2002) (**Figure 15-étape 3**).

II.2.4 Le complexe ATG9-ATG18

Bien que les fonctions exactes de la protéine ATG9 chez les mammifères restent méconnues, quelques hypothèses ont été émises. En effet, comme la protéine ATG9 est associée à des bicouches lipidiques, elle peut être partiellement responsable de la formation de la membrane des autophagosomes d'une manière ATG18-dépendante (**Figure 15-étape 4**) (Reggiori et al., 2005). L'étude de Simonsen a démontré que ATG9 peut jouer un rôle dans l'architecture des autophagosomes, probablement en régulant l'allongement du phagophore (Simonsen and Stenmark, 2008).

II.2.5 La fusion autophagosome-lysosome

Une fois que l'autophagosome est fusionné au niveau de chaque côté, il se rapproche d'un lysosome voisin et forme un autolysosome (Darsow et al., 1997) (**Figure 15-étape 5**). Cette fusion implique Rab GTPases, les protéines membranaires lysosomales LAMP1 et LAMP2 (Saftig et al., 2008), L'ATPase AAAtype SKD1 (Nara et al., 2002), le réseau microtubulaire (Kochl et al., 2006), le pH de la vacuole lysosomale critique pour l'activation des hydrolases acidiqes (Kawai et al., 2007).

La membrane interne des autophagosomes et les composants du cytoplasme séquestrés sont ensuite dégradés par les hydrolases lysosomales (**Figure 15-étape 6**). Une fois les macromolécules sont dégradées à l'intérieur du lysosome, les unités monomériques sont exportées vers le cytosol pour le recyclage (Klionsky and Emr, 2000).

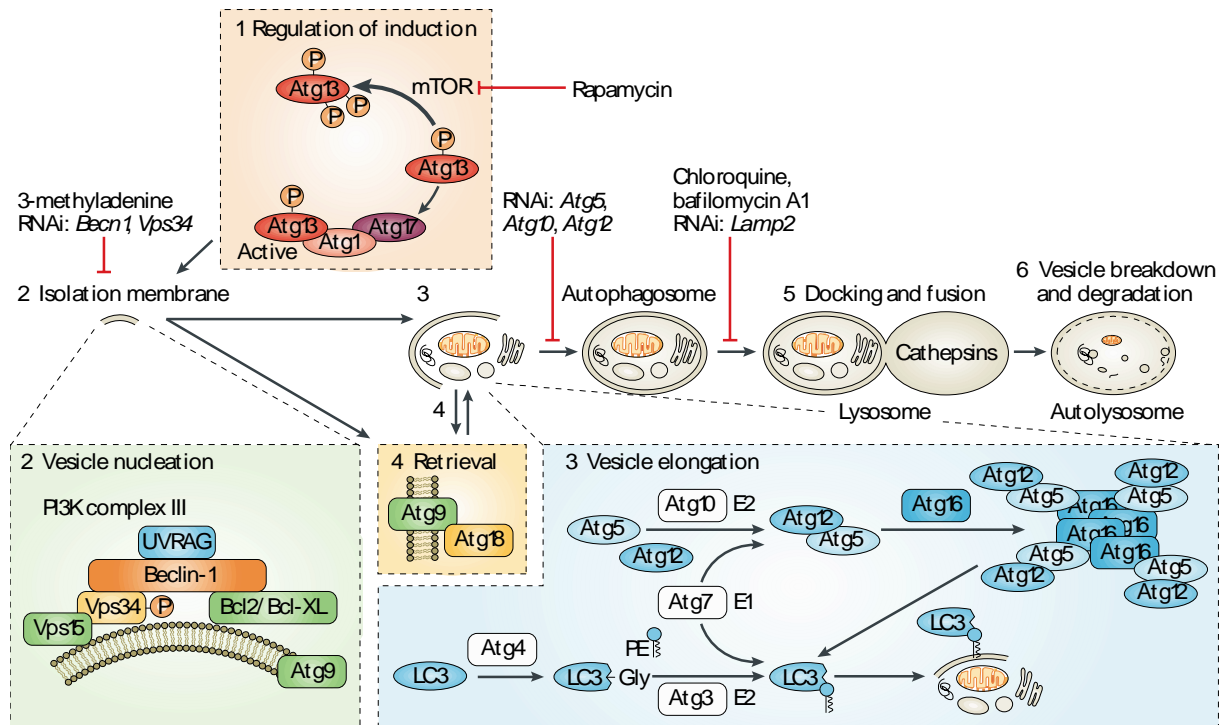


Figure 15 : Représentation schématique de la régulation moléculaire des différentes étapes du processus autophagique

Au niveau moléculaire, les protéines Atg forment différents complexes qui agissent au niveau des différentes étapes du processus autophagique. Les inhibiteurs pharmacologiques et les ARN interférents qui sont capables d'inhiber certaines étapes de ce processus sont également élucidés (D'après Maiuri C et al. Mol Cell Biol, 2007).

II.3 Les voies de signalisation majeures impliquées dans la régulation de l'autophagie

La complication de la machinerie moléculaire de l'autophagie indique que sa régulation peut être extrêmement compliquée et qu'elle ferait intervenir plusieurs voies de signalisation. En effet, nombreuses sont les voies de signalisation majeures qui ont été présentées comme régulatrices de l'autophagie sous différentes conditions. Ces voies de signalisation peuvent interagir ensemble et réguler la cascade autophagique à différents niveaux.

II.3.1 La kinase TOR

La kinase TOR est le régulateur majeur de l'autophagie. Cette kinase est capable de désactiver l'autophagie dans des cellules en culture. En tant qu'inhibiteur d'autophagie, l'activité de TOR empêche la formation des complexes ATG y compris le complexe ATG1-ATG13-ATG17 (Kim et al., 2002; Mizushima et al., 2001, Suzuki et al., 2001). Elle intervient également au niveau des deux étapes de conjugaison décrites précédemment. Par conséquent, l'induction et l'expansion de la membrane d'isolement peuvent être bloquées. Inversement, la protéine TOR est inactivée quand une

cellule est en privation en nutriments. Ceci peut déclencher la cascade autophagique. Ainsi, l'inhibition de TOR s'avère être obligatoire pour l'induction de l'autophagie (Abeliovich et al., 2000). TOR représente donc le centre des voies de signalisation régulatrices de l'autophagie (**Figure 16**).

II.3.2 PI3-kinase/Akt

La voie PI3-kinase/Akt régule l'autophagie essentiellement via la modulation de l'activité de la protéine TOR. En effet, la PI3-kinase phosphoryle la phosphatidylinositol (Abida and Gu, 2008; Ano et al., 2005) P2 afin de produire la phosphatidylinositol P3 (Abeliovich et al., 2003; Abida and Gu, 2008; Ano et al., 2005). Cette dernière active la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1). Ainsi, la PDK-1 peut phosphoryler et activer la protéine Akt. Celle-ci peut à son tour phosphoryler et inactiver le TSC (Tuberous Sclerosis Complex). Ce dernier est une GTPase qui active le complexe protéique et l'une de ses cibles est la Rheb. En effet, quand la TSC est inactivée par Akt, l'activité GTPase de Rheb est bloquée. Ceci induit une forme de Rheb liée à la GTP. Cette forme est l'activateur majeur de TOR (Inoki et al., 2005). Par conséquent, la PI3-kinase/Akt supprime l'autophagie suite à l'activation de TOR (**Figure 16**).

Les facteurs de croissance comme l'IGF (Insulin-like Growth Factor) se lient à leurs récepteurs tyrosine kinase, ce qui induirait l'activation de la PI3-kinase/Akt et TOR et ainsi le blocage de l'autophagie (**Figure 16**).

II.3.3 Les protéines de la famille Bcl-2

L'interaction de Bcl-2 avec Beclin-1 suggère que l'autophagie pourrait être soumise à la régulation par les protéines de la famille Bcl-2 (Liang et al., 1998). En 2005, Patingre et ses collaborateurs (Patingre et al., 2005) ont découvert les effets inhibiteurs de la protéine Bcl-2 sur l'autophagie à la fois chez la levure et dans des cellules de mammifères. Les effets inhibiteurs de Bcl-2 dépendent de la nature de son interaction avec Beclin-1 (Patingre et al., 2005). En effet, les activités anti-autophagiques ont été découverts non seulement pour Bcl-2, mais aussi pour leurs homologues tels que Bcl-XL, Bcl-w et Mcl-1 (Erlich et al., 2007; Maiuri et al., 2007; Periyasamy-Thandavan et al., 2008). La liaison et la séquestration de Beclin-1 par ces protéines perturbent la formation du complexe de la PI3-kinase (Vps34-Vps15-Beclin-1) qui est important pour l'induction de l'autophagie (**Figure 16**). Ainsi, l'autophagie est inhibée. Dans le cas contraire, les protéines BH3-only peuvent se lier à Bcl-2/Bcl-XL afin de permettre à Beclin-1 d'induire l'autophagie (Maiuri et al., 2007).

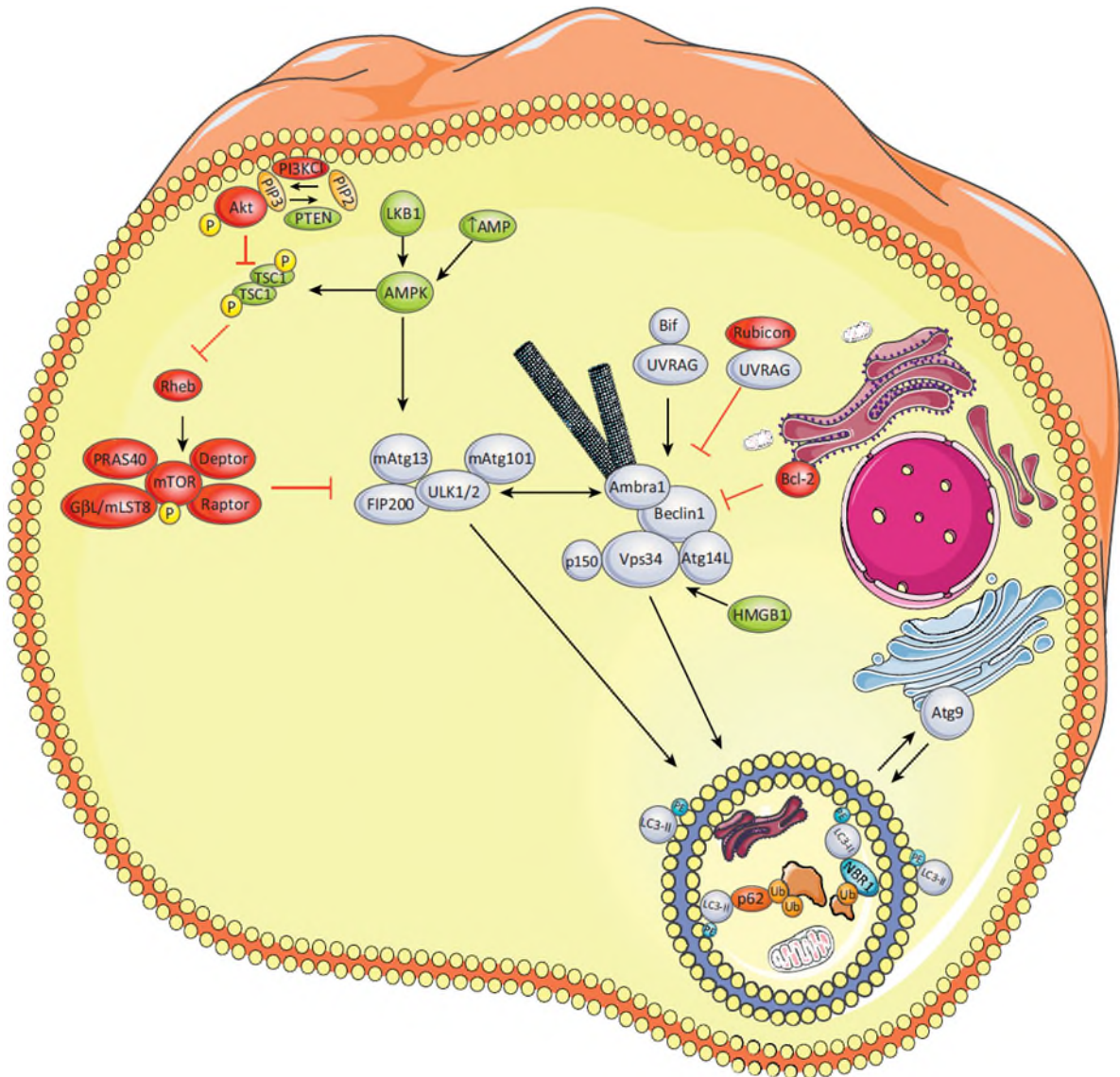


Figure 16: Les voies de signalisation majeures impliquées dans la régulation de l'autophagie

Le complexe mTORC1 contient mTOR, une protéine régulatrice, PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa), GβL/mLST8 (G protein b subunit-like protein) et DEPTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein). Au cours de l'activation de l'autophagie, mTORC1 se dissocie du complexe ULK, qui se transloque par la suite dans le site de la formation des autophagosomes conduisant à la déphosphorylation de ULK1 (Unc51-like kinase 1), ULK2, Atg13 et ainsi à l'activation de ULK1 et ULK2. Ces derniers phosphorylent par la suite FIP200 et Atg13. L'activation de l'autophagie suite à une énergie réduite se produit via AMPK (AMP-activated protein kinase) qui est activée par la kinase LKB1 pour se lier à ULK1. L'association AMPK-ULK1 joue un rôle central dans l'activation de l'autophagie étant donné l'effet inhibiteur de mTOR sur le complexe ULK. Le complexe PI3K3/Vps34 est impliqué dans la nucléation et l'assemblage de la membrane du phagophore. L'activité de ce complexe est régulée positivement par Atg14L, Bif-1/UVRAG et Ambra 1 et inhibée par Rubicon/UVRAG. La liaison de Bcl-2 à Beclin 1 inhibe l'autophagie. La localisation cellulaire de ce complexe est régulée par le complexe ULK. Au cours de l'activation de l'autophagie, ULK1 phosphoryle Ambra 1 et le complexe PI3K3 et permet la relocalisation de ce complexe dans le réticulum endoplasmique (ER). Les protéines inhibitrices de l'autophagie sont représentées en rouge, ses activateurs sont représentés en vert (Adapté de Maes H et al., Cell, 2013).

II.3.4 p53

Le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle bien identifié dans l'induction de l'apoptose. Il peut induire l'apoptose indirectement via la transcription des gènes pro-apoptotiques ou directement via l'activation des molécules de la perméabilisation mitochondriale comme Bax (Jiang and Dong, 2008; Tesniere et al., 2008). Des études récentes ont suggéré un rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie. Cependant, ces études sont controversées car elles décrivent à la fois un rôle de régulation positive et négative de l'autophagie de p53. En effet, en 2005, Feng et son équipe ont démontré que l'activation de p53 suite à un stress cellulaire peut inactiver la voie de signalisation TOR conduisant à l'activation de l'autophagie (Feng et al., 2005). Plus tard, Crighton et al. ont découvert DRAM (Dommages-Regulated Autophagy Modulator) en tant que cible transcriptionnelle de p53 et ont démontré que son activation induit l'autophagie (Crighton et al., 2006). En revanche, Tasdemir et al. ont prouvé récemment que l'autophagie est dramatiquement induite quand p53 est inhibée (Tasdemir et al., 2008). En effet, plus tard des études ont démontré que p53 peut réguler positivement l'autophagie via son activité transcriptionnelle (localisation dans le noyau), mais quand elle est localisée dans le cytoplasme, elle exerce un rôle inhibiteur de l'autophagie (Green and Kroemer, 2009) (**Figure 17**). Enfin, en fonction de sa localisation cellulaire, p53 peut avoir un rôle pro- et anti-autophagique (**Figure 17**).

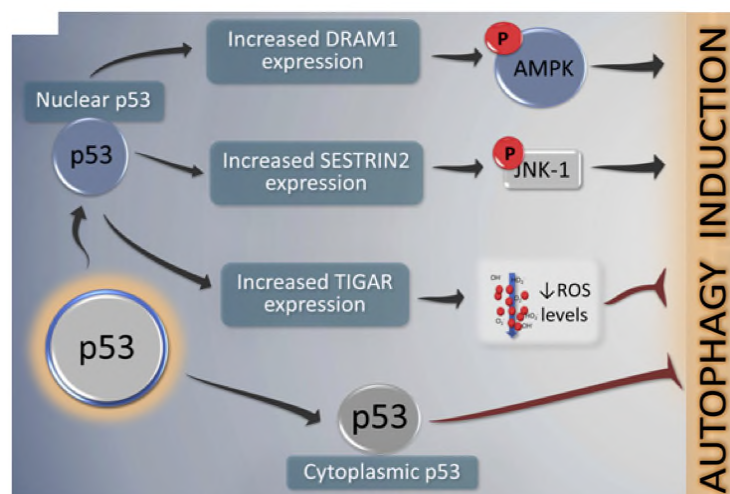


Figure 17: Le double rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie

p53 joue un rôle de régulateur positif de l'autophagie via son activité transcriptionnelle et un rôle de régulation négative via ses fonctions cytoplasmiques. En tant que facteur de transcription, p53 active plusieurs inducteur de l'autophagie y inclus DRAM1 (qui active JNK1) et Sestrin1 (qui se lie au complexe TSC1/TSC2-AMPK afin d'induire la phosphorylation de TSC2 via l'AMPK). L'un des gène régulé par p53 et qui inhibe l'autophagie est TIGAR, une fructose-2,6-bisphosphatase qui régule négativement le niveau intracellulaire de ROS (Bensâad et al., EMBO J., 2009) (Adapté de Kroemer G et al., Cell, 2010).

II.3.5 IKK/NF-k-B

La dérégulation de la voie NF-kB est associée au développement du cancer, à sa progression et à la résistance aux traitements anti-cancéreux (Wong and Tergaonkar, 2009). Récemment, Dr. Djavaheri et collaborateurs ont démontré que l'autophagie joue un rôle dans plusieurs fonctions cellulaires régulées par NF-kB (Djavaheri-Mergny et al., 2006). En effet, cette équipe a établi que l'activation de NF-kB est un médiateur de la répression de l'autophagie via la régulation de mTOR (Djavaheri-Mergny et al., 2006). Plus tard, Dr. Dan et collaborateurs ont démontré que l'activation de mTOR dans des cellules tumorales PTEN-déficientes implique IκB kinase (IKK), une sous-unité catalytique du complexe IKK qui contrôle l'activation de NF-kB (Dan and Baldwin, 2008). L'ensemble de ces études a mis la lumière sur un rôle suppresseur de l'autophagie de NF-kB. Néanmoins, une étude a récemment démontré son rôle activateur de l'autophagie (Copetti et al., 2009). En effet, cette équipe a montré que le membre de la famille NF-kB, p65/RelA (v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A), régule positivement les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine Becline 1 dans différents modèles cellulaires (Copetti et al., 2009).

NF-kB est activé lorsque son inhibiteur (IκB) est phosphorylé par la kinase IKK (IκB-kinase). L'activation de IKK est médiée par une autre kinase TAK1 (Baud and Karin, 2009). L'expression constitutive des sous-unités de IKK stimule l'autophagie via une voie NF-kB-indépendante. Cette voie se base sur l'activation de l'AMPK et de JNK1 (Criollo et al., 2010). Néanmoins, il peut y avoir des mécanismes à la fois IKK-dépendants et NF-kB-indépendants pour l'induction de l'autophagie (Kroemer et al., 2010) (**Figure 18**).

Enfin, les mécanismes qui orientent la voie de signalisation NF-kB vers un rôle activateur ou suppresseur de l'autophagie restent à éclaircir.

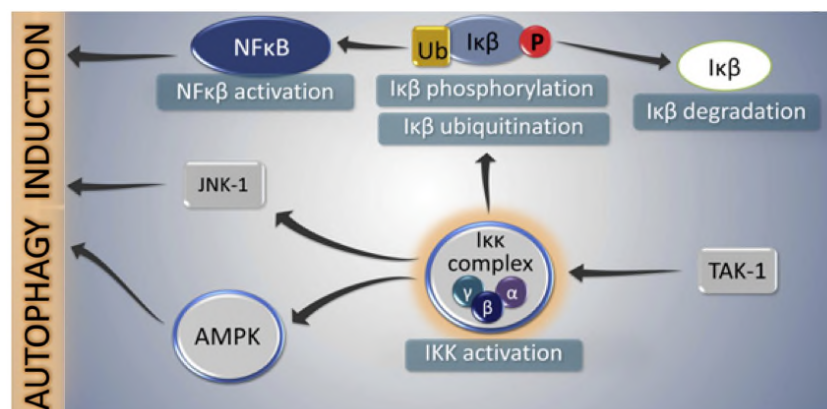


Figure 18: Le rôle de la voie IKK-NF-kB dans la régulation de l'autophagie

NF-kB est activé lorsque son inhibiteur (IκB) est phosphorylé par la kinase IKK (IκB-kinase). L'activation d'IKK est médiée par une autre kinase TAK1 (Baud and Karin, Nat Rev Drug Discov, 2009). L'expression constitutive des sous-unités d'IKK stimule l'autophagie via une voie NF-kB-indépendante. Cette voie se base sur l'activation de l'AMPK et de JNK1 (Criollo et al., EMBO J., 2010) (Adapté de Kroemer G et al., Cell, 2010).

II.3.6 L'AMPK

L'AMPK (AMP-dependent protein kinase) est impliquée dans l'induction de l'autophagie sous des conditions de privation en glucose, de l'hypoxie, de l'ischémie, du choc thermique, ou du stress oxydatif (Kahn et al., 2005). Chez la levure, l'induction de l'autophagie suite au stress métabolique implique l'AMPK (Wang et al., 2001). Cependant, l'implication de l'AMPK dans l'autophagie chez les mammifères reste un sujet à controverse. Néanmoins, des études récentes de Meijer, Codogno et Meley ont précisé le rôle de l'AMPK dans l'autophagie dans des cellules de mammifères métaboliquement stressées (Meijer and Codogno, 2007; Meley et al., 2006). Le mécanisme majeur utilisé par l'AMPK pour induire l'autophagie est la suppression de la voie de signalisation TOR. En effet, l'AMPK peut inhiber directement TOR par phosphorylation. De plus, l'AMPK peut activer la TSC, ce qui conduit à l'inhibition de TOR et ainsi à l'induction de l'autophagie (Meijer and Codogno, 2007; Meley et al., 2006) (**Figure 16**).

II.3.7 Les MAPKs

Les protéines MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) y compris ERK1/2, p38 et JNK sont une famille de sérine thréonine kinases impliquée dans un large éventail de fonctions cellulaires. L'activation des MAPKs a été décrite dans différents modèles d'autophagie (Corcelle et al., 2007; Roux and Blenis, 2004). En effet, pendant la privation en nutriments, à la fois ERK1 et ERK2 sont activés. Ainsi, l'inhibition de ERK1/2 empêche l'induction de l'autophagie (Petiot et al., 2000). De plus, une étude a établi que les acides aminés sont capables d'inhiber l'autophagie en ciblant ERK1/2 (Pattingre et al., 2003). En outre, des travaux plus récents de Wei ont démontré le rôle essentiel de JNK dans la phosphorylation de Bcl-2 (Wei et al., 2008). En effet, cette équipe a prouvé que JNK1, et non pas JNK2, est activée au cours du stress dû à la privation en nutriment. Ainsi JNK1 phosphoryle Bcl-2 au niveau de plusieurs sites. Ceci induit sa dissociation de Beclin-1 et ainsi l'induction de l'autophagie (Wei et al., 2008).

Enfin, le rôle des MAPKs dans l'autophagie est assez complexe et peut être dépendant du contexte cellulaire.

II.4 Rôle de l'autophagie dans le cancer

Le double rôle de l'autophagie dans la suppression et la progression tumorale a été identifié. Cependant, il existe un manque de connaissance des facteurs qui influent sur l'équilibre des fonctions anti-tumorales et pro-tumorales de l'autophagie. En effet, l'autophagie pourrait être un mécanisme anti-tumoral, en limitant la prolifération et l'instabilité chromosomique des cellules tumorales, en

prévenant l'inflammation et/ou en induisant la mort autophagique suite au traitement des cellules tumorales par des agents anti-cancéreux. Mais, elle pourrait aussi être un mécanisme promoteur de tumeur en permettant la survie des cellules cancéreuses en réponse au stress métabolique et aux agents anti-cancéreux.

II.4.1 L'autophagie comme suppresseur tumoral

L'autophagie peut être un mécanisme de suppression tumorale en détruisant les organelles endommagées et en limitant l'instabilité génomique et la croissance cellulaire (Mathew et al., 2009). En effet, les souris Beclin1^{+/-} développent des tumeurs, ce qui indique que Beclin1 pourrait être un gène suppresseur de tumeur (Qu et al., 2003). Un lien moléculaire potentiel entre l'autophagie défectueuse et la tumorigénèse implique l'accumulation des agrégats de la protéine p62 et l'endommagement des mitochondries. Ceci pourrait provoquer une altération de l'ADN qui induit une instabilité génomique (Mathew et al., 2009).

Le knockdown de la protéine p62 dans des cellules défectueuses en autophagie empêche la réponse aux endommagements de l'ADN (Mathew et al., 2009). La relation entre l'autophagie défectueuse et l'accumulation de la protéine p62 avec la tumorigénèse a été également démontrée dans une étude dans laquelle des souris p62^{+/-} ont été protégées de carcinomes pulmonaires comparées aux souris sauvages (Duran et al., 2008). L'autophagie peut également protéger contre la progression tumorale en limitant la nécrose et l'inflammation chronique qui sont associées à la sécrétion de la protéine pro-inflammatoire HMGB1 (Tang et al., 2010). Ensemble, ces études montrent un rôle suppresseur de tumeurs de l'autophagie (**Figure 19-(A)**).

II.4.2 L'autophagie comme inducteur de la survie des cellules tumorales

Les données indiquent que le rôle prédominant de l'autophagie dans les cellules cancéreuses est de conférer une tolérance au stress qui sert à maintenir la survie des cellules tumorales (Degenhardt et al., 2006). En effet, la délétion des gènes essentiels de l'autophagie dans les cellules tumorales potentialise l'induction de la mort cellulaire (White and DiPaola, 2009). Les cellules cancéreuses ont des exigences métaboliques élevées en raison de la prolifération cellulaire. A titre d'exemple, dans des modèles *in-vivo*, l'exposition à un stress métabolique est capable d'affaiblir la survie des cellules autophagie-déficientes en comparaison avec des cellules autophagie-compétentes (Mathew et al., 2009).

Les stressés cytotoxique et métabolique ainsi que l'hypoxie sont capables d'activer l'autophagie afin de recycler l'ATP et de maintenir la biosynthèse et la survie cellulaires.

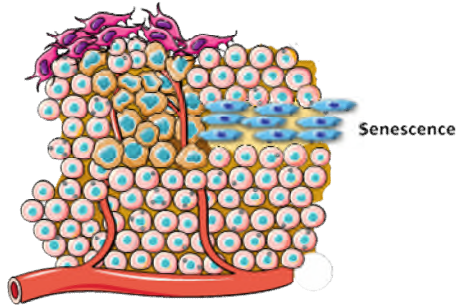
Des niveaux élevés d'autophagie ont été détectés dans des lignées tumorales et dans des échantillons tumoraux. Ces niveaux d'autophagie permettent la croissance des cellules tumorales via la maintenance de la production de l'énergie. L'inhibition de l'autophagie dans ces cellules conduit à une régression tumorale (Yang et al., 2011). De plus, dans des cellules cancéreuses survivant à la chimiothérapie et/ou radiothérapie, l'activation de l'autophagie peut induire une dormance dans les cellules cancéreuses résiduelles qui contribuerait à la récurrence et à la progression tumorale (Lu et al., 2008).

Des travaux récents indiquent que les lignées tumorales humaines ayant des mutations activatrices en H-Ras et K-Ras ont des niveaux élevés d'autophagie (Guo et al., 2011). Dans ces cellules, la suppression de l'autophagie est essentielle pour inhiber la croissance cellulaire.

L'ensemble de ces études indique que l'autophagie est capable de maintenir la survie des cellules tumorales (**Figure 19-(B)**).

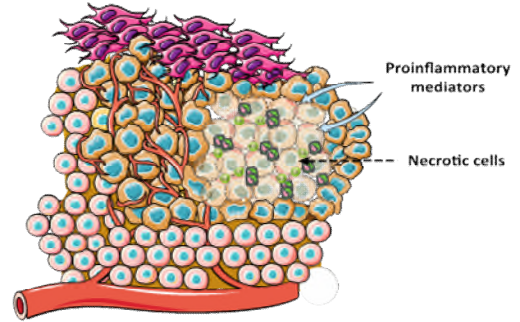
(A) Autophagy as tumor suppressor

(1) Functional autophagy



- ↑ Quality control
- ↑ Senescence

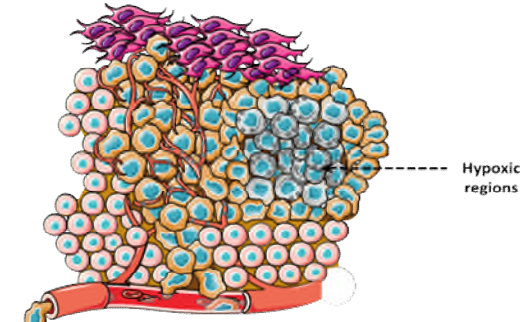
(2) Dysfunctional autophagy



- ↑ ROS production, ↑ mitochondrial and DNA damage, ↑ genomic instability
- ↑ p62 accumulation, ↑ protein-aggregates accumulation, ↑ Nrf2-ARE activity, ↑ proinflammatory NF-κB signaling, ↑ IL-6 production
- ↑ Macrophages infiltration
- ↑ Necrosis, when apoptosis is compromised

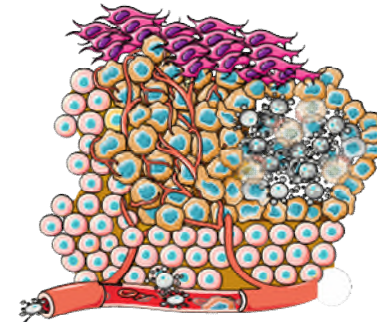
(B) Autophagy as tumor promoter

(1) Functional autophagy



- 'Autophagy addiction', especially in hypoxic regions
- ↑ Tumor growth, ↑ metastasis
- ↓ Anoikis

(2) Dysfunctional autophagy



- ↑ Cell death, especially in hypoxic regions
- ↓ Tumor growth, ↓ metastasis

Key:	Cancer Cell (CC)	Apoptotic CC	Senescent CC	Macrophage	Hypoxic/starved CC
	Hypoxic/starved ACC	Interleukin-6	Cancer-associated fibroblast (CAF)		

Figure 19: Le double rôle de l'autophagie dans la progression tumorale

Cette figure représente les mécanismes décrits récemment pour établir le rôle suppresseur ou promoteur de tumeurs de l'autophagie. (A) L'autophagie en tant que mécanisme suppresseur de tumeur. (1) L'autophagie agit comme un mécanisme de contrôle de la qualité qui, en situation de stress cellulaire, restaure l'homéostasie ou induit la sénescence, empêchant ainsi la tumorigenèse. (2) L'instabilité génomique, l'inflammation chronique, l'accumulation de p62, ou l'inflammation associée à l'initiation et la progression d'une tumeur sous des conditions défectueuses en autophagie soutiennent un rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie. (B) L'autophagie en tant que mécanisme de progression tumorale. (1) «Autophagy addiction», surtout observée dans les régions hypoxiques des tumeurs solides. Une diminution de l'anoïkis aide à maintenir la viabilité des cellules tumorales en favorisant les métastases. (2) L'augmentation du taux de la mort des cellules tumorales, en particulier dans les régions hypoxiques, et la réduction de la croissance tumorale et les métastases observées sous des conditions de déficit en autophagie indiquent que l'autophagie est un mécanisme de progression tumorale (D'après Maes H et al., Cell, 2013).

II.4.3 Rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire

En plus de la fonction cytoprotectrice de l'autophagie, l'autophagie accompagnée de la mort cellulaire non apoptotique a été décrite (Kanzawa et al., 2005; Shao et al., 2004). L'induction de la mort cellulaire autophagique à l'aide des médicaments anticancéreux peut se produire en fonction du type cellulaire et du patrimoine génétique. Par exemple, dans des cellules tumorales rénales VHL déficientes, une nouvelle petite molécule (STF-62247) est capable de promouvoir la mort cellulaire via l'induction de l'autophagie (Turcotte et al., 2008). Toutefois, les preuves *in-vivo* sont limitées.

La réussite de l'induction de la mort autophagique dans les cellules tumorales pour une thérapie anticancéreuse reste à élucider.

II.4.4 Rôle de l'autophagie dans la sénescence

La sénescence cellulaire représente un état de l'arrêt du cycle cellulaire maintenu par l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire (p16/INK4a, p21Cip1 et p27/Kip1) (Ewald et al., 2010). Le phénotype de sénescence peut être induit par des oncogènes, des drogues endommageant l'ADN ou du stress oxydatif. Leur capacité à induire la sénescence est renforcée par les suppresseurs de tumeurs: p53 et la protéine Rb (Ewald et al., 2010). L'autophagie et la sénescence représentent deux différentes réponses cellulaires au stress. Récemment, une étude a établi que l'autophagie peut servir de médiateur à la sénescence via l'oncogène Ras (Young et al., 2009). De même, plusieurs études ont proposé la sénescence comme mécanisme de dormance tumorale où l'autophagie est le médiateur (Lu et al., 2008; Gewirtz, 2009). Inversement, une étude a démontré que l'inhibition de l'autophagie dans des cellules tumorales peut inhiber la sénescence (Young et al., 2009).

II.4.5 Rôle des microRNAs dans la régulation de l'autophagie

Il est bien admis que les contrôles traductionnels et post-transcriptionnels jouent un rôle important pendant le stress cellulaire. Cependant, ce n'est que dans les dernières années que des travaux ont été consacrés à l'étude du rôle des miRNAs dans le processus autophagique. En effet, dernièrement, Zhu a reporté pour la première fois l'implication des miRNAs dans l'autophagie, en démontrant que le miR-30a cible Beclin 1 et qu'il mime l'activation de l'autophagie induite par la rapamycine (Zhu et al., 2009). Des études récentes soutiennent davantage le rôle de l'autophagie où le miR-30a sert de médiateur pour augmenter l'efficacité de l'Imatinib contre les cellules de la leucémie myéloïde chronique (Yu et al., 2012). Le miR-30a sensibilise également les cellules tumorales à la cisplatine toujours en régulant l'expression de Beclin 1 (Zou et al., 2012).

Récemment, plusieurs miRNAs ont été présentés comme des médiateurs du processus autophagique. Jegga a démontré, en se basant sur des analyses bioinformatiques, que les miR-130,

miR-98, miR-124, miR-204 et miR-142 ont des fonctions régulatrices dans le processus autophagique (Jegga et al., 2011). Plus tard, le miR-130a a été prouvé capable de bloquer le flux autophagique dans les cellules de leucémie lymphoïde chronique, et cela en diminuant le niveau d'expression de ses cibles, à savoir ATG2B et DICER1. Ces derniers sont essentiels à la formation des autophagosomes (Kovaleva et al., 2012). Le miR-101 a été dernièrement décrit comme un puissant inhibiteur de l'autophagie. Ce miRNA supprime l'autophagie induite par la rapamycine dans les cellules tumorales mammaires. En effet, un certain nombre de cibles clés telles que STMN1, RAB5A et ATG4D ont été identifiées comme cibles directes du miR-101 (Frankel et al., 2011). Le miR-375 a été également identifié comme inhibiteur de l'autophagie via le ciblage de la protéine ATG7 dans des cellules de carcinome hépatocellulaire (Chang et al., 2012). En outre, le miR-376B est capable de cibler les protéines ATG4C et Beclin-1, ce qui induit l'inhibition de l'autophagie induite par la privation en nutriments et par la rapamycine dans des cellules tumorales mammaires (Korkmaz et al., 2012). D'autre part, l'expression du miR-7 dans des lignées cellulaires du cancer du poumon et de l'œsophage induit l'autophagie via l'inhibition de l'expression de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Tazawa et al., 2012). Une étude récente a démontré que le miR-502 inhibe directement l'autophagie en diminuant l'expression de RAB1B dans des lignées cellulaires du cancer du côlon (Zhai et al., 2013). RAB1B est une petite GTPase de la famille de Ras qui peut moduler l'activité autophagique dans les cellules HeLa via la régulation de la formation des autophagosomes (Zoppino et al., 2010).

Outre la contribution à la prolifération ou à la mort cellulaires, l'autophagie induite par les drogues anticancéreuses joue également un rôle important dans la chimiorésistance en particulier à la Cisplatine (Claerhout et al., 2010). En effet, le traitement à la Cisplatine active l'autophagie dans différentes cellules cancéreuses et diminue le niveau d'expression de plusieurs miRNAs. Ces derniers ciblent plusieurs régulateurs clés de l'autophagie tels que le miR-199a-5p contre ATG7, le 33 miR-181 et le miR-374a contre ATG5, le miR-630 contre ATG12 et le miR-519a contre Beclin 1 (Huang et al., 2012).

Ces résultats soutiennent une nouvelle stratégie de traitement visant à surmonter la chimiorésistance en modulant la régulation de l'autophagie par les miRNAs.

Les différents miRNAs qui régulent les gènes impliqués dans l'autophagie sont illustrés dans la **Figure 20**.

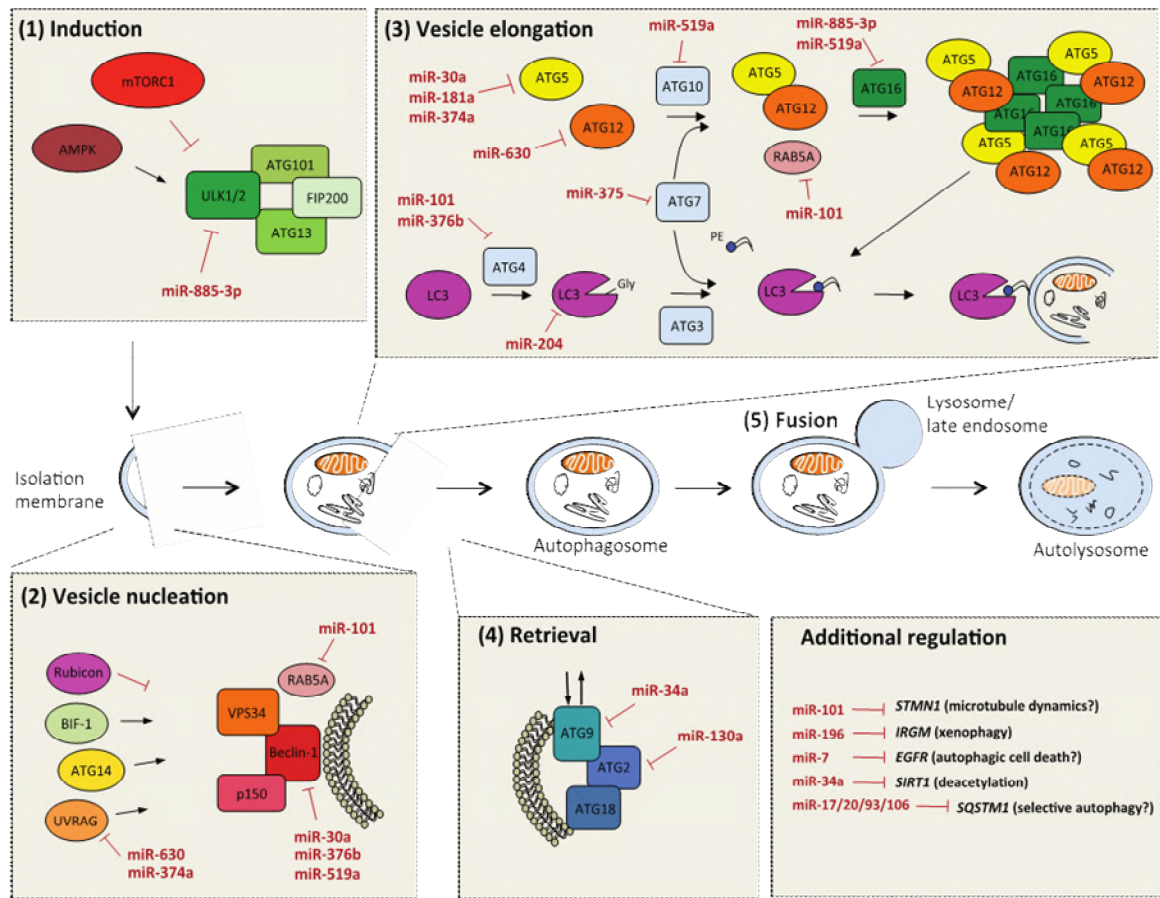


Figure 20: Les miRNAs impliqués dans la régulation du processus autophagique

(1) L'induction de l'autophagie est régulée par le complexe ULK, composé de ULK1/2, FIP200, ATG101 et ATG13; ces complexes sont à leur tour régulés par les voies de signalisation mTORC1 et AMPK. Le miR-885-3p régule directement l'ULK2. (2) La nucléation de la vésicule autophagique implique le complexe Beclin 1 régulé par les miRNAs: miR-30a, miR-376b et miR-519a. D'autres régulateurs de cette étape du processus autophagique sont: miR-101 (RAB5A), miR-630 et miR-374a (UVRAG). (3) l'élongation de la vésicule autophagique est contrôlée par miR-30a, miR-181a et miR-374a (ATG5), miR-630 (ATG12), miR-376b (ATG4), miR-204 (LC3), miR-375 (ATG7), miR-519a (ATG10 et ATG16), miR-885-3p (ATG16) et miR-101 (ATG4 et RAB5A). (4) La formation du phagophore implique les miRNAs suivant: miR-34a (ATG9) et miR-130a (ATG2). (5) La fusion entre les autophagosomes et les lysosomes résulte de la rupture de la vésicule autophagique et la dégradation du matériel séquestré par les hydrolases lysosomiques. Au jour d'aujourd'hui, aucun miRNA n'a été identifié comme étant régulateur de cette étape du processus autophagique. D'autres miRNAs régulateurs de l'autophagie ont été identifiés: miR-101, miR-196, miR-7, miR-34a et la famille des miR-17/20/93/106. Néanmoins, leurs mécanismes de régulation de l'autophagie sont méconnus (D'après Frankel L et Lund A, Carcinogenesis, 2012).

II.4.6 Rôle de l'autophagie dans l'acquisition des propriétés de cellules souches cancéreuses

Dans des cellules tumorales du cancer du sein, le phénotype CD44⁺/CD24⁻ est communément attribué à des sous-populations cellulaires avec des propriétés de cellules souches cancéreuses (Macintosh et al., 2012; Galavotti et al., 2013). L'équipe de Menendez a nouvellement établi que

l'autophagie régule positivement le phénotype CD44⁺/CD24⁻ des cellules tumorales du cancer du sein. De plus, l'équipe de Jue Zhang a récemment montré que l'autophagie pourrait être importante non seulement pour la survie, mais également pour le maintien d'un phénotype invasif, migratoire, résistant au traitement des cellules CD44⁺/CD24⁻ (Galavotti et al., 2013; Li et al., 2008). De plus, le blocage du flux autophagique diminue drastiquement le nombre de cellules tumorales du cancer du sein possédant un phénotype CD44⁺/CD24⁻. De plus, les gènes associés à l'autophagie DRAM1 et SQSTM1 régulent la motilité et l'invasion des cellules souches du glioblastome (Caja et al., 2011). Une autre étude a montré que Beclin 1 joue un rôle dans la tumorigénicité des cellules tumorales du cancer du sein portant des propriétés de cellules souches cancéreuses (Gong et al., 2013). Le fait qu'un certain nombre de régulateurs de l'autophagie est fortement exprimé dans les cellules tumorales portant une signature mésenchymateuses, qui définit intrinsèquement l'agressivité et l'invasion a suggéré que l'autophagie agit avec le processus de l'EMT afin de réduire la prolifération en faveur d'une meilleure motilité cellulaire. La question concernant l'existence d'un éventuel lien entre l'EMT et l'autophagie est traitée pendant la première partie de mes travaux de thèse qui montrent que l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux suite à la transfection des cellules épithéliales avec des plasmides contenant des gènes qui codent pour des facteurs de transcription inducteurs de l'EMT, ou suite à un traitement par le TNF- α , induit l'autophagie. Cette induction de l'autophagie s'accompagne de l'acquisition de propriétés de cellules souches cancéreuses à savoir: CD44⁺/CD24⁻, une activité ALDH élevée, une Side Population abondante, une surexpression de quelques marqueurs de cellules souches cancéreuses (SOX2, OCT4 et Nanog), la formation de sphéroïdes et la génération des tumeurs in-vivo) (Akalay et al., 2013a). L'ensemble de ces études confirme l'existence d'un lien entre l'autophagie et l'acquisition des propriétés de cellules souches cancéreuses.

II.4.7 Rôle de l'hypoxie dans la régulation de l'autophagie

Comme les études montrent une corrélation de l'autophagie avec une augmentation de la survie des cellules tumorales (Bellot et al., 2009; Menrad et al., 2010; Tasdemir et al., 2008) ou une diminution de cette dernière (Papandreou et al., 2008; Azad et al., 2008), le rôle de l'autophagie dans les tumeurs hypoxiques est controversé. En effet, des études ont démontré que l'autophagie induite par l'hypoxie peut promouvoir la survie tumorale par plusieurs mécanismes y compris la suppression des mitochondries endommagées qui produisent ROS (Cytotoxic Reactive Oxygen Species) (Menrad et al., 2010). De plus, l'autophagie est censée subvenir aux besoins énergétiques de la cellule pendant l'hypoxie, en libérant des métabolites qui peuvent être oxydés pour produire l'ATP. La manière via laquelle les cellules s'adaptent à leurs besoins énergétiques est à travers l'AMPK. Etant donné que le

rapport intracellulaire de l'AMP par rapport à l'ATP augmente, l'activité AMPK favorise l'induction de l'autophagie et sert comme un moyen à prévenir les manques énergétiques et la mort cellulaire. En revanche, l'autophagie induite par l'hypoxie peut également diminuer la croissance et la survie tumorales (Papandreou et al., 2008; Azad et al., 2008).

Aussi, pour bien concevoir les thérapies anti-cancéreuses, est-il crucial de savoir quand et comment l'autophagie orchestre la survie des cellules tumorales en prenant en considération la complexité du milieu hypoxique dans le micro-environnement tumoral.

II.4.8 L'autophagie et la réponse immunitaire anti-tumorale

L'autophagie représente un lien essentiel entre une chimiothérapie efficace et les réponses immunitaires anti-tumorales observées dans des modèles précliniques (Amaravadi et al., 2011). En effet, l'autophagie est importante pour le bon fonctionnement de plusieurs types de cellules immunitaires, y compris les lymphocytes T et les macrophages (Pua and He, 2007). Ainsi, il est possible que les effets suppresseurs que l'inhibition de l'autophagie ait sur le système immunitaire puissent atténuer la réponse de la tumeur aux thérapies anti-autophagiques. À titre d'exemple, l'induction de l'autophagie en réponse à certaines thérapies peut favoriser la libération extracellulaire de la protéine HMGB1 (High-Mobility Group Box 1) (Thorburn et al., 2009). Cette protéine peut se lier et activer les TLRs (Toll-like Receptors) sur les cellules dendritiques, ce qui accroîtrait la réponse anti-tumorale via les lymphocytes T cytotoxiques (Apetoh et al., 2007) (**Figure 21**).

En effet, une étude a établi que l'inhibition de l'autophagie *in-vitro* dans des cellules de glioblastome s'accompagne d'une diminution de la libération extracellulaire de la protéine HMGB1 (Thorburn et al., 2009). Thorburn a conclu donc que l'inhibition de l'autophagie peut diminuer l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale.

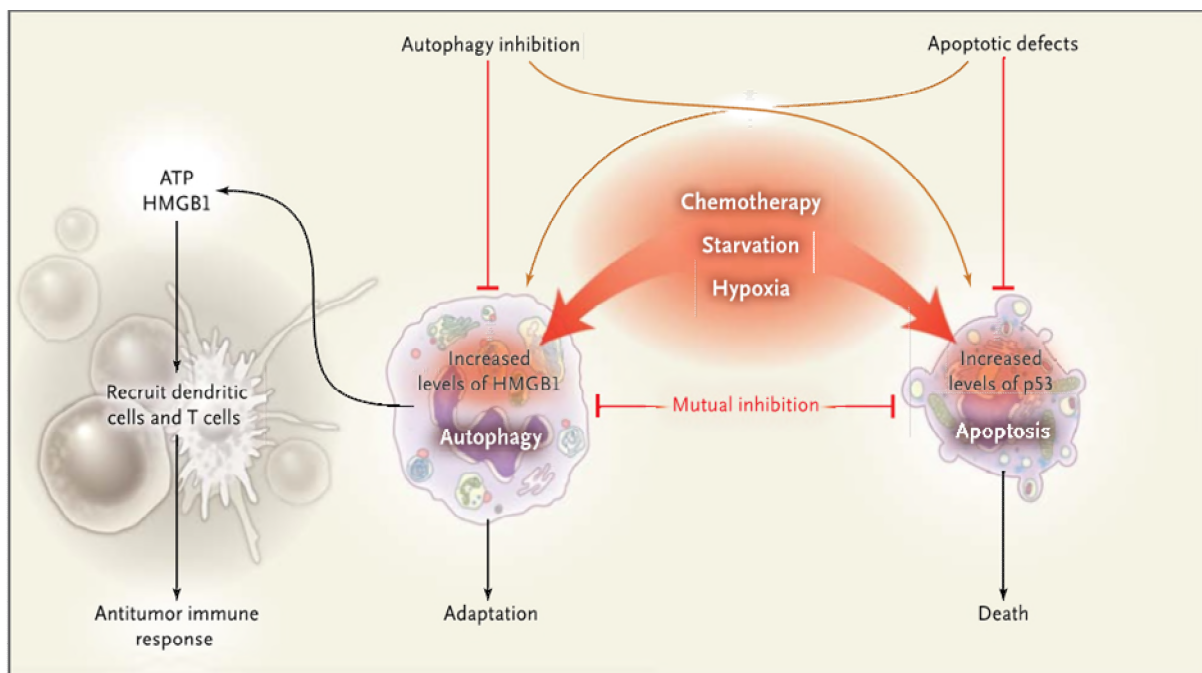


Figure 21: L'autophagie et la réponse immunitaire

L'induction de l'autophagie dans les cellules tumorales via la chimiothérapie conduit à une réponse immunitaire dans les tumeurs transplantées. L'autophagie peut être induite via la chimiothérapie, la radiothérapie ou d'autres mécanismes de stress cellulaire y compris l'hypoxie. La libération de l'ATP dans le milieu extracellulaire durant le processus autophagique permet le recrutement des cellules dendritiques et des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+, ce qui induit une réponse immunitaire anti-tumorale. HMGB1: High-Mobility Group Box 1 (D'après Weiner L et Lotze M, N Engl J Med, 2012).

Néanmoins, d'autres études, éventuellement au sein de notre laboratoire, ont prouvé que l'inhibition de l'autophagie restaure la susceptibilité des cellules tumorales hypoxiques à la lyse induite par les lymphocytes T cytotoxiques via la régulation de l'expression de pSTAT3 (Noman et al., 2011). De plus, la première partie de mon travail de thèse démontre que l'EMT est capable d'induire une diminution de la susceptibilité des cellules tumorales du cancer du sein à la lyse induite par les lymphocytes T cytotoxiques via l'induction de l'autophagie (Akalay et al., 2013a; Akalay et al., 2013b) (**Figure 12-Chapitre I**). Les résultats détaillés de cette étude sont présentés dans la partie résultats.

Ces études dévoilent aussi que l'autophagie peut avoir un rôle dans la résistance des cellules tumorales à la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique.

II.4.9 L'autophagie dans les essais cliniques:

Etant donné que les régulateurs de l'autophagie sont composés de kinases (Atg1/Unc-51-like kinase 1/2/3, Vps34), de protéase (Atg4) et de deux systèmes de conjugaison ubiquitine-like

(Mizushima, 2007), le développement d'inhibiteurs spécifiques de l'autophagie pour le traitement du cancer devrait être possible. Il existe également les voies de signalisation à la fois mTOR-dépendantes et –indépendantes qui régulent l'activation de l'autophagie et qui peuvent être ciblées. Actuellement, l'hydroxychloroquine (HCQ) qui bloque l'acidification des lysosomes et la dégradation des autophagosomes est disponible en tant qu'inhibiteur de l'autophagie et est en cours d'utilisation dans les essais cliniques pour le traitement des tumeurs solides et des tumeurs d'origine (**Tableau 3**) (NIH/NCI clinicaltrials.gov). La plupart de ces essais cliniques sont composés d'une combinaison de la HCQ et de la chimiothérapie. Ces essais partent de l'hypothèse selon laquelle l'autophagie peut être responsable de la résistance aux thérapies anti-cancéreuses et que la HCQ peut augmenter la cytotoxicité des traitements en inhibant l'autophagie.

Bien que la HCQ ne soit pas un inhibiteur exclusif de l'autophagie, il est relativement non cytotoxique et il bloque le flux autophagique via l'inhibition de l'étape finale de la dégradation des lysosomes. Il reste à prouver si la HCQ peut bloquer l'autophagie dans les tumeurs humaines *in-vivo*, et comment le fond génétique des tumeurs influence la réponse aux traitements. À cette fin, l'identification de biomarqueurs et des signatures qui reflètent l'état fonctionnel de l'autophagie et qui permettent la modulation thérapeutique de l'autophagie dans les tumeurs humaines reste à développer.

Tableau 3: L'utilisation de l'Hydroxychloroquine dans des essais cliniques et la modulation de l'autophagie (NIH/NCI clinicaltrials.gov).

Condition	Intervention	Phase	Sponsors/Collaborators	ClinicalTrials.gov Identifier	Title
Prostate Cancer	dacetzatel hydroxy-chloroquine	II	The Cancer Institute of New Jersey (CINJ), The National Cancer Institute (NCI)	NCT00786682	A Phase II Study of Docetaxel and Modulation of Autophagy With Hydroxychloroquine for Metastatic Hormone Refractory Prostate Cancer
Prostate Cancer	hydroxy-chloroquine	II	CINJ, NCI	NCT00726596	Autophagic Cell Death in Patients With Hormone-Dependent Prostate-Specific Antigen Progression After Local Therapy for Prostate Cancer
Multiple Myeloma, Plasma Cell Neoplasm	bortezomib hydroxy-chloroquine	III	U. Pennsylvania, NCI	NCT00568880	A Phase III Trial of Hydroxychloroquine Added to Bortezomib for Relapsed/Refractory Myeloma
Brain, Central Nervous System Tumors	hydroxy-chloroquine temozolomide	III	U. Pennsylvania, NCI	NCT00486603	A Phase III Trial of Hydroxychloroquine in Combination With Radiation Therapy and Concurrent and Adjuvant Temozolomide in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme
Breast Cancer	hydroxy-chloroquine ixabepilone	III	CINJ, NCI	NCT00765765	Phase III Study of Ixabepilone in Combination With the Autophagy Inhibitor Hydroxychloroquine for the Treatment of Patients With Metastatic Breast Cancer
Lung Cancer	bevacizumab carboplatin hydroxy-chloroquine paclitaxel	III	CINJ, NCI	NCT00728845	Modulation of Autophagy With Hydroxychloroquine in Combination With Carboplatin, Paclitaxel and Bevacizumab in Patients With Advanced/Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer - A Phase III Study
Adult Solid Tumors	hydroxy-chloroquine temozolomide	I	U. Pennsylvania, NCI	NCT00714181	A Phase I Study of Hydroxychloroquine in Combination With Temozolomide in Patients With Advanced Solid Tumors
Non-Small Cell Lung Cancer	gefitinib, hydroxy-chloroquine	III	National University Hospital, Singapore, Massachusetts General Hospital, AstraZeneca	NCT00809237	A Phase II With a Lead in Phase I Study to Examine the Tolerability, Safety Profile and Efficacy of Hydroxychloroquine and Gefitinib in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer
Cancer	hydroxy-chloroquine sunitinib maleate	I	CINJ, NCI	NCT00813423	Autophagic Modulation With Anti-Angiogenic Therapy in Patients With Advanced Malignancies: A Phase I Trial of Sunitinib and Hydroxychloroquine
B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia	hydroxy-chloroquine	II	North Shore Long Island Jewish Health System	NCT00771056	Phase II Study to Evaluate the Tolerability and Efficacy of Treatment of Previously Untreated B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) Patients With Hydroxychloroquine

Chapitre III



III. Développement de la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique

III.1 Différenciation des effecteurs T cytotoxiques anti-tumoraux

Le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale résulte d'une parfaite orchestration des différentes interactions cellulaires impliquant les cellules tumorales, les CPA et les effecteurs cytotoxiques, en particulier les lymphocytes T $CD8^+$. Lors de l'émergence de tumeurs dans les tissus périphériques, les différentes composantes des systèmes immunitaires inné et adaptatif agissent alors en coopération afin d'éliminer, tout du moins potentiellement, les cellules cancéreuses (**Figure 22**). Ce n'est qu'en 1999 que Charles Janeway propose une théorie intégrative suggérant une liaison étroite entre ces deux types de réponses (Medzhitov and Janeway, 1999). Il est désormais admis que les CPA constituent l'interface entre la réponse innée et la réponse adaptative et permettent la différenciation des lymphocytes T $CD8^+$ en effecteurs cytotoxiques, les principaux acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique.

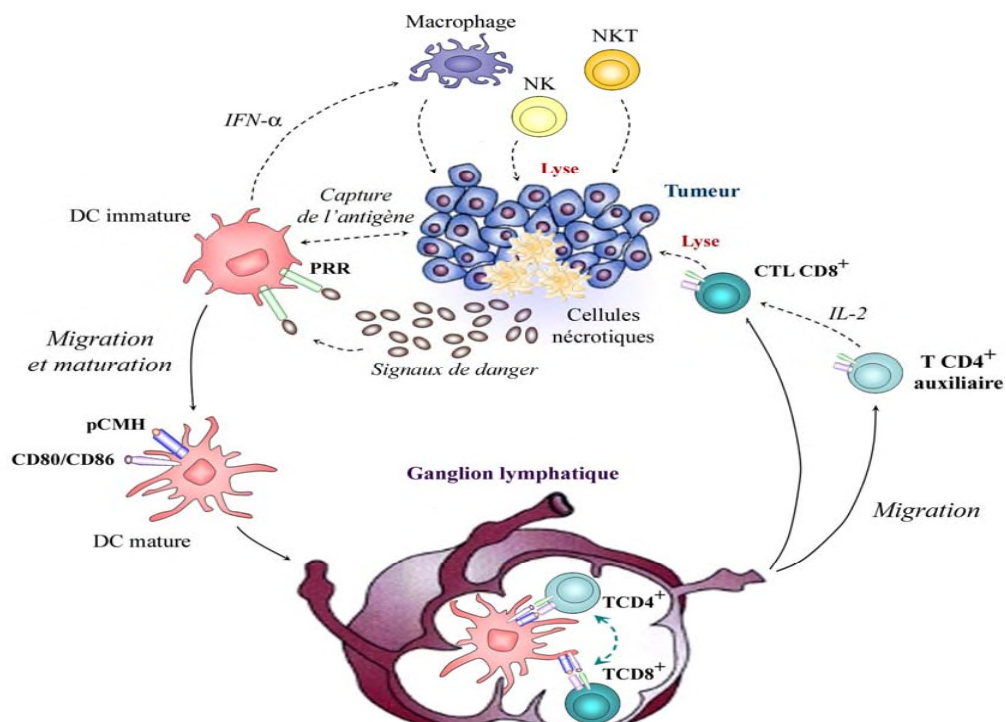


Figure 22: l'immuno-surveillance anti-tumorale

Au cours du développement d'une tumeur, certaines cellules cancéreuses sont lysées de manière non spécifique par les effecteurs de l'immunité innée (macrophages, cellules NK et cellules NKT). Des antigènes associés aux tumeurs sont alors relargués dans le microenvironnement tumoral et sont captés par les DC immatures. La maturation de ces CPA professionnelles en cellules capables de présenter efficacement les peptides antigéniques est induite suite à la reconnaissance, via les PRR, de signaux de danger produits par les cellules tumorales, notamment par les cellules nécrotiques. Les DC acquièrent également la capacité à migrer au niveau des ganglions lymphatiques où elles activent les cellules de l'immunité adaptative, à savoir les lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$. Les lymphocytes T $CD4^+$ ont un rôle auxiliaire dans l'initiation et le maintien de la réponse T anti-tumorale. Suite à leur différenciation en CTL dans les ganglions lymphatiques, les lymphocytes T $CD8^+$ migrent au niveau du site tumoral et lysent les cellules cancéreuses dont ils sont spécifiques.

III.1.1 Différenciation des lymphocytes T CD8+ en effecteurs cytotoxiques

Les lymphocytes T CD8+ sont les acteurs majeurs des réponses immunitaires anti-tumorales spécifiques. Suite à leur activation au niveau des ganglions lymphatiques, ils prolifèrent et se différencient en cellules effectrices ou en cellules mémoire. Cette différenciation repose sur d'importantes modifications de leur profil d'expression génique conduisant à la modification de leur capacité migratoire et l'acquisition de différentes fonctions. D'un point de vue phénotypique, différentes sous-populations ont été caractérisées sur la base de l'expression de diverses molécules de surface telles que CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27 et CD28, ou d'agents cytotoxiques comme l'IFN- γ , le TNF (Tumor Necrosis Factor)- α , Fas ligand (FasL), les granzymes et la perforine (Romero et al., 2007; Sallusto et al., 1999; Takata and Takiguchi, 2006) (**Figure 23**). La différenciation des lymphocytes T naïfs (CD45RA+/CCR7+/CD27+/CD28+) en cellules effectrices (CD45RA+/CCR7-/CD27-/CD28-) est définie par l'expression des molécules cytotoxiques nécessaires à leur activité lytique au niveau du site tumoral, mais également par la modification de leur profil migratoire. En effet, les lymphocytes T effecteurs perdent leur potentiel de domiciliation (*homing*) au niveau des ganglions lymphatiques, ce qui est caractérisé par la diminution de l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 et de la molécule d'adhésion CD62L. A l'inverse, ils acquièrent la capacité à migrer dans les tissus, plus particulièrement au niveau des sites inflammatoires, suite à l'induction de l'expression de molécules d'adhésion telles que CD44 ou les intégrines β_1 et β_2 et de récepteurs aux chimiokines inflammatoires comme CCR5 et CCR2 (Kaeck et al., 2002). Par ailleurs, le tropisme des lymphocytes T effecteurs pour un tissu extra- lymphoïde particulier est clairement dépendant du site de capture de l'Ag par les DC (Agace, 2006; Calzascia et al., 2005). En effet, l'environnement tissulaire d'où proviennent les DC leur permet d'acquérir l'habileté à générer des lymphocytes T ayant la capacité à migrer sélectivement vers un tissu particulier *via* l'induction de l'expression de différents récepteurs d'adhérence et chimioattractants.

Naïf	T _{CM}	T _{EM} précoce	T _{EM} tardif	Effecteur	
CD27 ^{high}	CD27 ^{high/low}	CD27 ^{high/low}	CD27 ^{high/low}	CD27 ^{low}	CD27 ⁻
CD28 ⁺	CD28 ⁺	CD28 ⁺	CD28 ⁺	CD28 ⁻	CD28 ⁻
CD45RA ⁺	CD45RA ⁻	CD45RA ⁻	CD45RA ⁻	CD45RA ⁻	CD45RA ^{-/+}
CCR7 ⁺	CCR7 ⁺	CCR7 ⁻	CCR7 ⁻	CCR7 ⁻	CCR7 ⁻
CCR5 ⁻	CCR5 ⁻	CCR5 ^{high}	CCR5 ^{low/-}	CCR5 ^{low/-}	CCR5 ^{low/-}
	Perforine ⁻ GrA ⁺ GrB ⁻		Perforine ^{low} GrA ⁺ GrB ⁺		
Perforine ⁻ GrA ⁻ GrB ⁻	Perforine ^{low} GrA ⁺ GrB ⁻		Perforine ^{high} GrA ⁺ GrB ⁺		

Figure 23: Différenciation des lymphocytes T CD8+

Les différents stades de maturation et d'activation des cellules T CD8+ se distinguent par l'expression de molécules de surface telles que CD45RA, CD28, CD27, CCR7 ou CCR5, et de protéines intracellulaires comme la perforine et les granzymes A et B (GrA et GrB). TEM, cellules T effectrices mémoires ; TCM, cellules T centrales mémoires ; GrA et GrB, granzyme A et granzyme B (d'après Takata and Takiguchi, 2006).

Au cours de la réponse primaire à l'Ag, une population de lymphocytes T CD8+ mémoire est également générée (Ahmed and Gray, 1996; Woodland and Kohlmeier, 2009). La phase initiale d'expansion clonale des lymphocytes T est suivie par une phase de contraction caractérisée par l'apoptose massive des cellules effectrices (Lau et al., 1994; Murali-Krishna et al., 1998). A l'issue de cette phase de déléation, une population mémoire spécifique émerge et se maintient à long terme indépendamment de l'Ag. Cette population est caractérisée par sa capacité à répondre plus rapidement lors d'une seconde exposition antigénique (Veiga-Fernandes et al., 2000). Les cellules T mémoires peuvent être subdivisées en deux populations majeures en fonction de leur profil d'expression des récepteurs de *homing* vers les ganglions lymphatiques : les cellules T centrales mémoires CD45RA⁻/CCR7⁺/CD62L^{high} (T_{CM}, central memory), localisées préférentiellement au niveau des tissus lymphoïdes secondaires, et les cellules T effectrices mémoires CD45RA⁻/CCR7⁻/CD62L^{low} (T_{EM}, effector memory) présentes dans les tissus périphériques. Par ailleurs, ces deux populations semblent avoir des fonctions effectrices distinctes (Lanzavecchia and Sallusto, 2005). En effet, les cellules T_{EM} exercent des fonctions effectrices immédiates au niveau des sites inflammatoires et peuvent rapidement produire des cytokines telles que l'IFN-γ après activation. A l'inverse, les cellules T_{CM} présentent peu ou pas de fonctions effectrices mais acquièrent une capacité proliférative importante et peuvent se différencier en effecteurs après stimulation antigénique. Les cellules T_{EM} exercent un pouvoir lytique plus important que les cellules T_{CM} *ex vivo* probablement parce qu'elles expriment plus de perforine à l'état basal et également après activation (Champagne et

al., 2001).

III.2 Recherche de la cible tumorale

La migration des lymphocytes T cytotoxiques (CTL, Cytotoxic T Lymphocyte) au niveau du site tumoral est un évènement clé dans le processus de la réponse spécifique à l'encontre de la tumeur. En réponse au développement tumoral, l'inflammation conduit à l'infiltration du tissu par des cellules effectrices, notamment les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la tumeur nouvellement générés. Les chimiokines produites par les cellules tumorales, ainsi que par les autres cellules présentes dans le microenvironnement, telles que CXCL12 (*via* CXCR4) et CCL2 (*via* CCR4) sont essentielles pour attirer les cellules T effectrices au sein du tissu tumoral (Brown et al., 2007; Homey et al., 2002; Silzle et al., 2003). De la même manière, les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL, Tumor Infiltrating Lymphocyte) peuvent à leur tour recruter et activer les monocytes en relargant des chimiokines telles que CCL3, CCL4 et CCL5 (RANTES) (Winter et al., 2007). De plus, il a été proposé que la surexpression de SIP au niveau du site de l'inflammation participe à la rétention des lymphocytes T dans les tissus périphériques (Ledgerwood et al., 2008).

Les CTL infiltrent les tumeurs solides en se déplaçant à l'interface entre la matrice extracellulaire et la tumeur, mais également au niveau des jonctions entre cellules tumorales. Par ailleurs, dans des modèles de tumeurs expérimentales, il apparaît que les CTL atteignent leur cible tumorale après une phase de mouvements à travers le stroma adjacent plutôt qu'en empruntant les vaisseaux intratumoraux, et adoptent une morphologie allongée (Boissonnas et al., 2007). Il a été montré que les interactions LFA-1/ICAM-1 sont impliquées dans ces déplacements *in vitro* (Jaaskelainen et al., 1992). Cependant les mécanismes *in vivo* ne sont pas encore bien identifiés. Par ailleurs, les TIL en mouvement semblent être en contact avec le réseau constitué des fibres de la matrice extracellulaire (MEC), ce qui suggère que la MEC guide leur migration au sein de la tumeur potentiellement *via* l'engagement des intégrines.

Des études par microscopie biphotonique intravivale ont démontré qu'au cours de la recherche de cibles potentielles, les lymphocytes adoptent des déplacements aléatoires similaires à ceux des lymphocytes T présents dans la zone corticale des ganglions lymphatiques. En présence du peptide antigénique, ce *scanning* rapide est suivi de l'arrêt de la migration et d'une interaction prolongée entre les CTL spécifiques de tumeur et leur cible (supérieure à 30 minutes). A l'inverse, certains lymphocytes n'établissent que des contacts séquentiels et transitoires (Mrass et al., 2006). Les raisons de cette différence de comportement ne sont pas encore connues, cependant il semblerait que la mort de la cellule cible par le relargage des granules cytotoxiques nécessite la mise en place d'interactions

prolongées (Breart et al., 2008). Par ailleurs, il a été décrit que les CTL retenus dans les tumeurs sont initialement localisés à la périphérie de la tumeur avant de s'infiltrer en direction du centre d'une manière dépendante de l'Ag (Boissonnas et al., 2007). A l'inverse, les CTL non spécifiques de la tumeur perdent progressivement leur mobilité et sont incapables d'envahir le centre de la tumeur (Mrass et al., 2006). Ces observations sont en accord avec une étude précédente montrant que les CTL spécifiques de TAA représentent une fraction substantielle des lymphocytes T CD8⁺ totaux présents au site tumoral (Romero et al., 2002). Par ailleurs, les CTL périphériques possèdent une vitesse de migration rapide jusqu'à leur arrêt induit par la reconnaissance du peptide antigénique présenté par la cellule cible. Les lymphocytes engagés dans une interaction stable peuvent éventuellement reprendre leur migration, notamment dans les régions où les cellules tumorales adjacentes ont été lysées, probablement à la recherche d'autres cibles intactes. Cependant, il reste à déterminer si l'infiltration en profondeur des tumeurs par les CTL est une conséquence directe de leur activation suite à la reconnaissance de l'Ag ou si elle résulte de la mise à disposition de nouveaux substrats de migration suite à la lyse spécifique des cellules tumorales.

Comme évoqué précédemment, l'étude menée par l'équipe de Bousso a révélé que les CTL restent la plupart du temps attachés aux cellules tumorales apoptotiques pendant plusieurs heures (Breart et al., 2008). Il a été estimé qu'un intervalle d'environ 6 heures est nécessaire à un CTL avant de pouvoir lyser une deuxième cellule cible, suggérant que le microenvironnement a un impact sur la fonction des TIL. Ceci implique que la balance entre la progression tumorale et l'attaque par les cellules effectrices puisse être en faveur de la tumeur, conduisant ainsi à l'échappement de la tumeur à l'immuno-surveillance. Cependant, il a été montré que les TIL peuvent éliminer indirectement les variants tumoraux ayant perdu l'expression des Ag dont ils sont spécifiques. En effet, les cellules stromales pouvant cross-présenter les peptides antigéniques issus des cellules tumorales exprimant l'Ag sont lysées par les CTLs spécifiques, ce qui permet de prévenir l'échappement tumoral au système immunitaire (Spiotto et al., 2004).

Chapitre IV



IV. Les effecteurs T cytotoxiques de la réponse immunitaire anti-tumorale

IV.1 La synapse immunologique et son rôle dans l'activation lymphocytaire T

IV.1.1 La synapse immunologique « mature »

Lors de l'interaction entre un lymphocyte T et sa cible, le TCR transduit une cascade de signaux activateurs aboutissant à une succession de remaniements intracellulaires et membranaires et à la formation d'une structure concentrique hautement organisée, définie par le terme de « synapse immunologique » (SI) en référence à la synapse neurologique (Dustin, 2002; Grakoui et al., 1999). Cette jonction stéréotypique a tout d'abord été identifiée au niveau des lymphocytes T CD4⁺ qui reconnaissent des complexes pCMH-II à la surface de CPA. Monks et collaborateurs ont observé que, suite au contact avec la CPA, les récepteurs impliqués dans la reconnaissance et l'adhérence, tels que le TCR et LFA-1 respectivement, sont spatialement ségrégués dans des aires distinctes, appelées complexes d'activation supramoléculaires (SMAC, *supramolecular activation cluster*), au niveau du site d'interaction (**Figure 24**). Le SMAC, caractérisé par une organisation concentrique, est composé d'une aire centrale (cSMAC), d'une région périphérique (pSMAC) ainsi que d'une région distale (dSMAC). Des études spatio-temporelles ont ensuite permis de mettre en évidence les différentes étapes de la maturation de la SI. Initialement, les molécules d'adhérence se concentrent au centre du site de contact alors que le TCR est présent à la périphérie. Puis, en quelques minutes, les molécules se réorganisent en inversant leur localisation pour former la SI mature (Grakoui et al., 1999).

La région centrale de la SI mature correspond à une zone d'apposition serrée entre les deux membranes, compte-tenu de la taille des molécules engagées, et regroupe les complexes TCR/pCMH-I, les molécules impliquées dans les cascades de signalisation telles que LAT (Linker of Activation of T cell), les protéines tyrosine kinases (PTK) FYN et LCK (Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase), ZAP-70 (Z-chain (TCR)-Associated Protein kinase 70kDa), la PKC- θ (Protein Kinase C- θ) et la phospholipase C γ (PLC- γ), ainsi que des molécules de costimulation comme CD28, CD2/LFA-2 et leurs ligands respectifs CD80 ou CD86, et CD58/CD48 (Huppa and Davis, 2003). La région périphérique regroupe les molécules d'adhérence telles que l'intégrine LFA-1 et son ligand ICAM-1, ainsi que la Taline et l'Ezrine, des protéines adaptatrices du cytosquelette (Das et al., 2002; Monks et al., 1998). D'autres molécules putativement inhibitrices, telles que la phosphatase CD45 et CD43, sont exclues de la zone de contact et sont regroupées dans le dSMAC (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001; Freiberg et al., 2002).

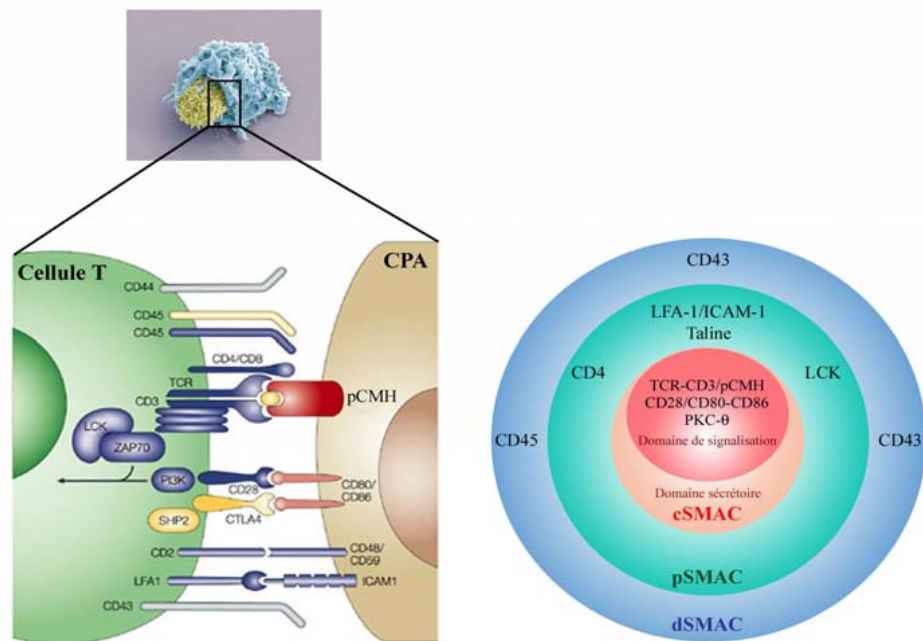


Figure 24: Vue générale de la synapse immunologique mature

À gauche, la coupe transversale de l'interaction entre un lymphocyte T et une CPA illustre les différents couples ligand/récepteur et molécules impliqués dans la signalisation. À droite, la vue schématique de la SI mature permet de distinguer le domaine central cSMAC, le domaine périphérique pSMAC et le domaine distal dSMAC. Le cSMAC regroupe les molécules de signalisation (TCR-CD3/pCMH) et de costimulation (CD28/CD80-CD86), et présente la particularité d'être subdivisé en deux régions distinctes au niveau d'un CTL : le domaine de signalisation et le domaine sécrétoire. Les molécules d'adhérence (LFA-1/ICAM-1) se concentrent dans le pSMAC, alors que les protéines de haut poids moléculaire (CD43, CD44, CD45) sont localisées dans le dSMAC (d'après Huppa and Davis, 2003).

Il a été initialement proposé qu'une telle organisation moléculaire pourrait être mécaniquement liée à une sensibilité accrue des lymphocytes T à la stimulation antigénique et donc essentielle à l'induction de l'activation lymphocytaire. Cependant, cette notion est aujourd'hui remise en question. En effet, il a été montré que les voies de signalisation suite à l'engagement du TCR, résultant en l'activation locale des protéines tyrosine kinases LCK et ZAP-70, peuvent être initiées en périphérie de la SI et précède la formation d'une SI mature caractérisée par la relocalisation des TCR dans le cSMAC (Trautmann and Randriamampita, 2003). De plus, la formation d'une SI fonctionnelle en l'absence de peptide antigénique a pu être observée entre un lymphocyte T et une DC, montrant que la reconnaissance de l'Ag n'est pas un événement préalable à cette formation (Revy et al., 2001). La SI mature n'est donc pas impliquée dans les voies de signalisation précoces du TCR, mais elle est probablement nécessaire au maintien de signaux soutenus, permettant l'activation complète des lymphocytes T.

Selon un modèle alternatif, la ségrégation moléculaire de la SI mature conduirait à la formation de deux aires fonctionnellement distinctes. Les microclusters de TCR, qui représentent les sous-unités minimales de transduction du signal, sont formés en périphérie (dans le pSMAC) et migrent au niveau du cSMAC où ils seraient internalisés et dégradés, ce qui contribuerait à la répression du signal TCR (Varma et al., 2006). Cemerski et collaborateurs ont récemment montré que la signalisation du TCR est observée dans le pSMAC, mais également dans le cSMAC, en fonction du temps et de la force de la stimulation antigénique (Cemerski et al., 2008). Il apparaît donc aujourd'hui que le cSMAC, initialement décrit comme une aire privilégiée pour la signalisation du TCR, pourrait servir de plateforme permettant de moduler l'activation lymphocytaire. De plus, il a été montré que des intégrines jouent un rôle essentiel en inhibant la centralisation des microclusters, ce qui met en évidence leur importance dans le processus d'activation lymphocytaire (Nguyen et al., 2008).

IV.2 Induction de l'activité lytique des effecteurs cytotoxiques

Les effecteurs cytotoxiques, en particulier les CTL et les cellules NK (natural killer), sont les acteurs majeurs de la réponse immunitaire grâce à leur capacité à reconnaître et à éliminer les cellules infectées par un pathogène et les cellules tumorales, en initiant l'apoptose. Différentes stratégies sont utilisées par ces effecteurs pour lyser leurs cibles. Le premier mécanisme de cytotoxicité correspond à l'engagement des récepteurs proapoptotiques à domaines de mort de la famille des récepteurs au TNF, Fas, TNF-RI, ainsi que TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5, dont les ligands sont respectivement FasL, TNF et TRAIL (TNFSF10) (Strasser et al., 2009). Ces protéines membranaires de type I comportent dans leur partie cytoplasmique un domaine de mort (DD) qui leur confère la capacité à recruter et activer la caspase-8 après engagement et agrégation des récepteurs, par l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles que FADD (Fas-Associated via Death Domain) et TRADD (TNF-receptor 1-associated via death domain).

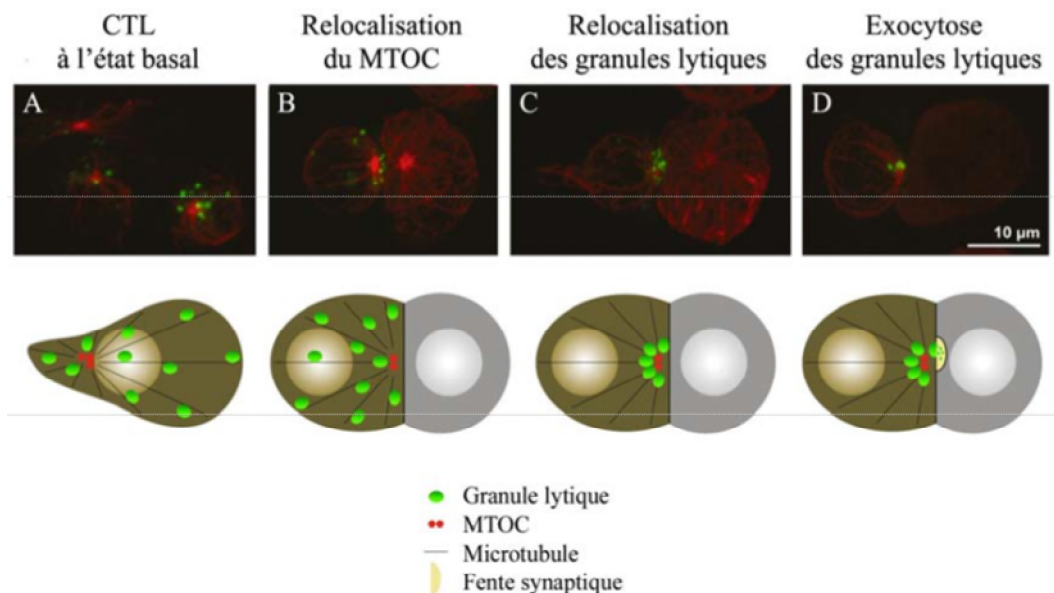
La deuxième voie de cytotoxicité mise en jeu fait intervenir le système perforine/granzymes et correspond à la voie majoritairement utilisée par les lymphocytes T CD8+ *in vivo* (Graubert et al., 1996; Shresta et al., 1998). Seule cette dernière voie indépendante des récepteurs sera traitée dans la suite du manuscrit.

IV.2.1 La synapse sécrétoire ou « Baiser de la mort »

Il apparaît maintenant clairement établi que certains facteurs solubles, comme des cytokines ou encore des molécules cytolytiques, peuvent être sécrétées de façon directionnelle dans la SI formée

entre un lymphocyte T et une CPA. Cette sécrétion synaptique, analogue à celle observée au niveau des synapses neuronales, permet un adressage très sélectif aux cellules cibles des molécules sécrétées. Poo et collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence ce phénomène. En effet, ces auteurs ont montré que les lymphocytes T déposés sur une membrane de Transwell sécrètent des cytokines préférentiellement du côté de la membrane présentant les anticorps (Ac) activateurs (Poo et al., 1988). De nombreuses études en imagerie corroborent aujourd'hui cette observation.

En comparaison avec l'interaction entre un lymphocyte T et une CPA qui peut durer plusieurs heures avant de se rompre, juste avant la division cellulaire, l'interaction de la cellule tueuse avec sa cible est relativement rapide et transitoire. Le processus de lyse dans son ensemble, appelé « baiser de la mort », implique la formation d'une synapse sécrétoire cytotoxique entre la cellule effectrice et sa cible d'une manière concomitante à la polarisation du MTOC au niveau de la zone de contact (**Figure 25**). Presque immédiatement, les granules lytiques sont acheminés jusqu'au MTOC *via* les microtubules grâce à un transport rétrograde (Stinchcombe and Griffiths, 2007). Ce phénomène est spécifique du lymphocyte T puisque le MTOC de la CPA ne présente pas une telle relocalisation au site de contact entre les deux cellules (Kupfer et al., 1987).



Par ailleurs, seule une partie des granules est relarguée, ce qui permet au CTL de réaliser des cycles répétés de reconnaissance antigénique, polarisation et cytolyse (Lyubchenko et al., 2001). De plus, lorsque le CTL est en contact avec deux cellules cibles, le MTOC de la cellule effectrice oscille entre les deux cibles, permettant ainsi la lyse des deux cellules (Kuhn and Poenie, 2002).

IV.2.1.1 Constitution des granules cytotoxiques

Au cours de la maturation des lymphocytes T CD8⁺ en CTL, les facteurs cytotoxiques sont compartimentés dans des lysosomes sécrétoires acidifiés, communément connus sous le nom de granules lytiques. En plus des molécules communes à tous les lysosomes, telles que LAMP-1 (Lysosome associated membrane protein-1, CD107a), LAMP-2 (CD107) ou encore LAMP-3 (CD63), les granules cytotoxiques regroupent de nombreuses protéines qui leur sont spécifiques au sein d'une matrice de protéoglycanes et dont les plus représentées correspondent à la perforine et aux sérine-protéases, encore appelées « granule-enzymes » ou granzymes (Blott and Griffiths, 2002).

La perforine induit la formation de canaux par multimérisation dans les membranes de manière dépendante du Ca²⁺ par un mécanisme analogue à celui de l'action de la molécule C9 du complément (Tschopp et al., 1986) et permet ainsi l'internalisation passive dans la cible d'autres constituants des granules (Young et al., 1986). De part cette fonction perforante, l'activité de la perforine est donc étroitement régulée par d'autres protéines présentes dans les granules cytotoxiques afin de protéger les CTL de son effet létal potentiel. D'une part, la calréticuline, une protéine chaperonne dépendante du Ca²⁺, pourrait inhiber la polymérisation de la perforine dans les granules et l'autolyse des CTL par leurs propres granzymes une fois libérés dans le cytosol (Fraser et al., 2000). D'autre part, la Cathepsine B, une cystéine protéase liée à la membrane des granules, est localisée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique suite à l'exocytose des granules cytotoxiques et permettrait ainsi la protection des CTL en induisant le clivage protéolytique et l'inactivation de la perforine (Balaji et al., 2002). Enfin, la perforine n'est active qu'à pH neutre, ce qui implique que celle-ci est conservée dans un état inactif dans l'environnement acide des granules cytotoxiques (Kuta et al., 1991).

Les granzymes correspondent à une famille de sérine-protéases hautement homologues constituée de 5 membres chez l'Homme (granzymes A, B, H, M et K) dont les plus abondants correspondent aux granzymes A et B (Lieberman, 2003; Pipkin and Lieberman, 2007). L'expression des granzymes est restreinte aux lymphocytes T activés (la plupart des lymphocytes T CD8⁺ et une faible proportion de lymphocytes T CD4⁺), aux thymocytes, aux lymphocytes T $\gamma\delta$ et aux cellules NK.

Le granzyme B a été le plus extensivement étudié mais des travaux récents se sont intéressés aux mécanismes d'action du granzyme A et autres granzymes. En fonction de leur spécificité de substrat, ces différents granzymes peuvent être groupés en 3 sous-familles : les granzymes A et K exercent une activité « trypsine-like », le granzyme M clive après des résidus aliphatiques tels que la méthionine, alors que les granzymes B et H présentent une activité « chymotrypsine-like » (Trapani, 2001). A l'instar des caspases, des cystéine-protéases jouant un rôle essentiel dans l'induction de l'apoptose, le granzyme B clive ses substrats après des résidus acides tels que l'acide aspartique.

Les granzymes sont synthétisés sous forme de proenzymes ; Ils sont activés sous l'action séquentielle de signal-peptidases puis de la cathepsine C (dipeptidyl peptidase D), présente au niveau des granules cytotoxiques, qui induit le clivage d'un dipeptide présent dans la région N-terminale de la proenzyme (Kummer et al., 1996; Pham and Ley, 1999). Cependant, une déficience en cathepsine C, tant chez la souris que chez l'Homme, n'entraîne qu'une diminution partielle de l'activité des granzymes et leurs fonctions lytiques, suggérant l'existence de voies alternatives permettant l'activation des proenzymes (Sutton et al., 2007).

Les granzymes et la perforine sont stockés dans des granules spécialisés grâce à un troisième constituant, la matrice de protéoglycanes. En effet, Metkar et collaborateurs ont montré que la perforine et le granzyme B interagissent de manière non covalente grâce à des interactions électrostatiques avec la serglycine pour former des complexes multimériques *in vitro* (Metkar et al., 2002; Raja et al., 2002). Par ailleurs, selon des études *in vivo* récentes, la serglycine apparaît essentielle au stockage du granzyme B, mais pas du granzyme A et de la perforine, ainsi qu'à la maturation des granules cytotoxiques sans jouer un rôle majeur dans l'apoptose induite par les CTL (Grujic et al., 2005).

Les granules cytotoxiques peuvent contenir d'autres protéines ayant une activité cytotoxique. En effet, il a été montré que FasL est également présent au niveau de ces lysosomes spécialisés (Bossi and Griffiths, 1999). Ainsi, lors de la dégranulation polarisée, l'expression de FasL est augmentée à la surface de la cellule effectrice et peut interagir efficacement avec son récepteur Fas exprimé à la surface de la cellule cible.

La granulysine est également un des composants des granules cytotoxiques. Il a été montré que ce peptide antimicrobien est capable d'induire l'apoptose, probablement par une voie distincte de celles induites par les récepteurs à « domaine de mort » et les granzymes (Kaspar et al., 2001). Par ailleurs, des études récentes ont montré que la granulysine peut exercer une activité proinflammatoire et chimioattractante, permettant ainsi l'amplification de la réponse immunitaire au site de

l'inflammation (Deng et al., 2005).

Enfin, CTLA-4, une glycoprotéine de la superfamille des Ig, correspond à un régulateur négatif de l'activation cellulaire capable d'interagir avec les molécules de costimulation CD80 et CD86 présentes à la surface des CPA entrant ainsi en compétition avec CD28 (van der Merwe et al., 1997). Lors de l'activation du lymphocyte T, des vésicules contenant CTLA-4 se relocalisent à la SI de façon dépendante du TCR et de la force du signal, ce qui correspond à un rétrocontrôle négatif permettant l'atténuation de la réponse cellulaire T (Egen et al., 2002).

IV.2.1.2 Polarisation du MTOC

Au sein de la cellule effectrice, les granules cytotoxiques sont attachés au cytosquelette de microtubules. Celui-ci constitue un réseau de fibres défini par une polarité et irradie à partir du centrosome (centre organisateur de microtubules ou MTOC) au niveau duquel est localisée l'extrémité négative des microtubules. Il a été montré que la sécrétion directionnelle des différents facteurs est dépendante de ce cytosquelette de microtubules. En effet, celui-ci joue un rôle clé dans l'établissement et la maintenance de la polarité cellulaire et constitue le support de la translocation des organelles et molécules de signalisation dans de nombreux types cellulaires (Hollenbeck, 2001; Nogales, 2001).

IV.2.1.3 Circulation et exocytose des granules cytotoxiques

Suite à la polarisation du MTOC au site de contact avec la cellule cible, les granules cytotoxiques sont acheminés jusqu'au MTOC *via* le réseau de microtubules. La membrane de cette dernière fusionne alors avec la membrane plasmique du CTL, permettant ainsi le relargage de leur contenu dans la fente synaptique (**Figure 26**). Cette sécrétion polarisée permet la lyse spécifique de la cellule cible en limitant l'exposition des cellules adjacentes au contenu des granules cytotoxiques.

Des études récentes ont identifié certaines protéines essentielles à l'exocytose des granules cytotoxiques. Une première approche a consisté à étudier les désordres génétiques combinant immunodéficiences à albinisme (Menasche et al., 2005). En effet, les CTL et les mélanocytes possèdent tous les deux des lysosomes sécrétoires, les granules lytiques et les mélanosomes respectivement, et présentent théoriquement au moins une partie de leur mécanisme de trafic cellulaire en commun. Le syndrome de Griscelli, caractérisé par un albinisme et un défaut de cytotoxicité des CTL et des cellules NK, est causé par une perte fonctionnelle de RAB27A, une GTPase de la famille RAB impliquée dans le trafic intracellulaire (Menasche et al., 2000). Par

ailleurs, dans les lymphocytes T issus de souris déficientes pour RAB27A (souris *ashen*), les granules lytiques sont relocalisés normalement au niveau de la SI après stimulation du TCR, mais présentent un défaut d'arrimage à la membrane (Stinchcombe et al., 2001a). De plus, une mutation dans la sous-unité α de la RAB géranylgeranyl transférase, une enzyme impliquée dans la prénylation et l'activation des RAB (souris *gunmetal*), entraîne une diminution de l'activité cytotoxique des CTL, mais également un défaut de la redistribution des granules lytiques à la synapse. Ceci suggère que RAB27A est impliqué dans l'étape finale de sécrétion et que d'autres protéines RAB sont probablement impliquées dans la polarisation des granules au niveau de la SI.

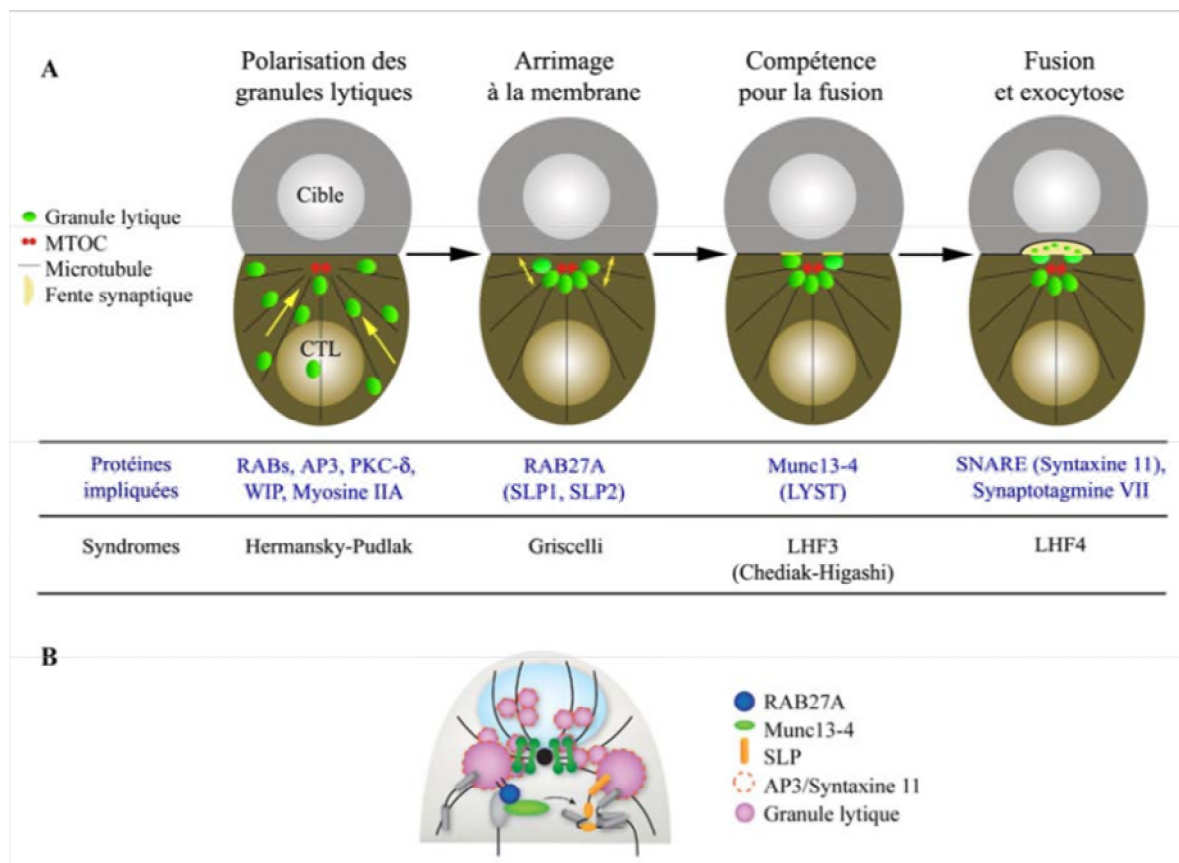


Figure 26: Polarisation et exocytose des granules cytotoxiques

A, L'exocytose des granules cytotoxiques dans les CTL peut être divisée en 4 étapes majeures : la polarisation des granules lytiques, leur arrimage à la membrane, l'acquisition de la compétence pour la fusion et l'exocytose de leur contenu. Pour chaque étape, les protéines impliquées ainsi que les syndromes associés sont indiqués. **B**, Représentation schématique du mode d'action des principales protéines dans les processus d'arrimage, *priming* et fusion des granules cytotoxiques. L'identité et la fonctionnalité de certaines protéines composant le complexe SNARE (éléments en gris) sont encore méconnues (d'après Huse et al., 2008).

Le syndrome de Chediak-Higashi, caractérisé par un albinisme partiel et un défaut de l'activité des CTL et des cellules NK, est causé par la mutation du gène codant pour la protéine LYST (Ward

et al., 2000). Les CTL dérivés des patients atteints de ce syndrome présentent des granules cytotoxiques géants qui ne sont pas sécrétés malgré une polarisation normale, ce qui suggère un rôle de LYST dans l'arrimage et/ou la fusion avec la membrane plasmique (Baetz et al., 1995). De façon intéressante, il a été montré que LYST est capable d'interagir avec les protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors), lesquelles sont impliquées dans le processus de fusion des vésicules avec le compartiment cible (Tchernev et al., 2002).

Le syndrome Hermansky-Pudlak de type 2, combinant également l'immunodéficience et l'albinisme, est dû à une mutation du gène codant pour la protéine adaptatrice AP-3 (Clark and Griffiths, 2003). Les CTL déficients pour AP-3 présentent de larges granules cytotoxiques et un défaut de leur polarisation à la SI. Un défaut similaire de polarisation des granules lytiques a également été observé au niveau de CTL déficients pour la PKC- δ , laquelle colocalise avec les granules cytotoxiques (Ma et al., 2008), et au niveau de cellules NK déficientes pour la protéine adaptatrice WIP (Krzewski et al., 2008) ou encore pour la myosine IIA (Andzelm et al., 2007). Il est donc probable que la PKC- δ , WIP, AP-3 et la myosine IIA agissent de manière coordonnée pour réguler la translocation des granules.

La lymphohistiocytose hémophagocytaire familiale (LHF) correspond à un autre type de désordre génétique qui est associé à un défaut de sécrétion au niveau des CTL mais pas des mélanocytes (Voskoboinik and Trapani, 2006). Alors que les bases moléculaires de la LHF de type 1 ne sont pas encore connues à ce jour, la LHF de type 2 est causée par des mutations dans le gène codant pour la perforine. La LHF de type 3 résulte, quant à elle, de mutations dans le gène codant pour Munc13-4. Chez les patients atteints de LHF de type 3, les granules cytotoxiques des CTL ne présentent pas de défaut d'arrimage, mais ne fusionnent pas avec la membrane plasmique (Feldmann et al., 2003). Par ailleurs, Munc13-4 interagit avec RAB27A, et il est localisé au niveau des granules cytotoxiques, suggérant un rôle pour Munc13-4 en aval de RAB27A dans le processus de sécrétion (Neeft et al., 2005). Des études ont récemment montré que RAB27A interagit avec les protéines SLP1 et SLP2 (synaptotagmin-like proteins), lesquelles pourraient être impliquées dans l'arrimage des granules cytotoxiques à la SI (Holt et al., 2008). L'implication de la synaptotagmine (Syt) VII dans le processus de dégranulation a également été suggérée (Fowler et al., 2007; Reddy et al., 2001). Enfin, la LHF de type 4 est causée par un défaut en syntaxine-11, une protéine de fusion SNARE, qui se traduit par une altération de l'exocytose des granules cytotoxiques sans perturbation de la polarisation (Bryceson et al., 2007).

La pertinence fonctionnelle de ces différentes protéines étant maintenant bien établie, il reste à déterminer comment elles contribuent mécaniquement à la circulation et à la sécrétion des granules cytotoxiques. Il est probable qu'elles fonctionnent d'une manière analogue à leurs homologues neuronaux.

IV.2.1.4 Sécrétion des chimiokines et cytokines

Après activation du TCR, les CTL produisent différents facteurs solubles (cytokines et chimiokines) qui ont un rôle actif dans la réponse immunitaire. Ces cellules sécrètent principalement l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2, qui potentialisent la présentation antigénique par les CPA et l'activité lytique des CTL, et MIP1- α , MIP- β , RANTES et IP-10, nécessaires au recrutement d'autres cellules au site de l'inflammation. Ces molécules sont la plupart du temps néosynthétisées après la stimulation du TCR, soit par augmentation de la transcription du gène, soit par traduction des transcrits préexistants. Par conséquent, leur sécrétion a lieu plusieurs heures après la reconnaissance initiale de l'Ag. En fonction du rôle de la cytokine/chimiokine sécrétée, deux modalités de sécrétion ont été décrites : la sécrétion polarisée et la sécrétion multidirectionnelle.

IV.2.2 Voie de cytotoxicité Perforine/granzyme

La voie Perforine/Granzymes est basée sur l'exocytose polarisée du contenu de granules cytotoxiques par les cellules tueuses (CTL et NK). Ces granules lytiques sont en fait des lysosomes sécrétoires spécialisés contenant différentes protéines impliquées dans la mort par apoptose de la cellule cible (Lieberman, 2003). Un des constituants essentiels de ces granules est la Perforine, qui présente une analogie de structure avec la protéine C9 du complément ayant la capacité de former des pores dans les membranes cellulaires. Les autres constituants essentiels de ces granules sont les Granzymes qui représentent une famille de sérine protéases. Ces Granzymes sont initialement synthétisés sous forme de pro-enzymes inactives qui sont par la suite activées par un clivage protéolytique induit par la Cathepsine C présente également au niveau des granules. Chez l'Homme et la souris, les deux types de Granzymes les plus abondants et les plus étudiés sont les Granzymes A et B. Le Granzyme B (GrB) présente une spécificité de substrat très similaire à celle des caspases et clive après un résidu d'acide aspartique. De plus, d'autres constituants essentiels de type protéoglycanes ont été plus récemment décrits. En particulier, la Serglycine apparaît comme une protéine majeure des granules. Il semble que le GrB se fixe de manière non covalente à la Serglycine, ce qui conduit à la formation de complexes macromoléculaires sous la forme desquels le GrB va être physiologiquement sécrété (Metkar et al., 2002). Chez l'Homme, les granules des CTLs contiennent d'autres protéines ayant une activité cytotoxique comme la granulysine.

Enfin, les granules contiennent aussi des protéines permettant aux CTL de se protéger de l'action cytotoxique de leurs propres granules. La Cathepsine B, qui est liée à la membrane des granules et qui se retrouve externalisée à la suite de leur exocytose, semble ainsi protéger les CTL en induisant le clivage protéolytique et l'inactivation de la Perforine (Balaji et al., 2002). Au niveau de la synapse sécrétoire, la cSMAC se caractérise par deux sous-domaines distincts : le domaine de signalisation évoqué précédemment, et un domaine sécrétoire où a lieu l'exocytose des granules (Bossi et al., 2002 ; Friedl et al., 2005). La migration des granules cytotoxiques du cytoplasme, où ils sont dispersés, vers la synapse sécrétoire dépend d'une réorientation et d'une polymérisation rapide du MTOC (MicroTubule Organizing Center) et de l'appareil de Golgi (Kupfer et al., 1985) vers la zone de contact entre le CTL et sa cellule cible, et plus précisément vers la région centrale cSMAC (**Figure 26**). Initialement, les granules semblent se regrouper derrière le MTOC avant de le contourner, de migrer vers la zone de contact et de s'aligner en contact étroit avec la membrane de la région sécrétoire du domaine cSMAC. L'exocytose polarisée a alors lieu au niveau de cette zone, dans une dépression formée face à la zone sécrétoire du CTL par la membrane de la cellule cible (Stinchcombe et al., 2001b). De plus, il semble qu'une faible proportion de granules soit relarguée pour induire la mort de la cellule cible (Lyubchenko et al., 2001) et que le MTOC puisse rapidement se polariser vers une autre cible (Kuhn and Poenie, 2002), rendant ce processus hautement efficace.

Après libération du contenu des granules cytotoxiques dans l'espace intercellulaire entre le CTL et la cellule cible, les Granzymes et la Perforine vont agir de manière synergique afin de permettre l'internalisation des Granzymes et le déclenchement du processus de mort cellulaire programmée. Le Granzyme B serait libéré sous forme de complexes en association avec la Serglycine et peut-être la Perforine. Le Granzyme B se lierait alors au récepteur membranaire CI-MPR (Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor) (Veugelers et al., 2006). Après endocytose des complexes, l'activité endosomolytique de la Perforine permettrait la libération du Granzyme B dans le cytoplasme de la cellule cible où ce dernier exerce son activité pro-apoptotique (Bolitho et al., 2007 ; Pipkin and Lieberman, 2007 ; Trapani and Smyth, 2002).

Une fois libéré dans le cytoplasme de la cellule cible, le Granzyme B clive de nombreux substrats et ainsi active des voies d'apoptose dépendantes ou non des caspases (**Figure 27**). Parmi les premiers substrats du Granzyme B identifiés, il a été montré que de nombreuses procaspases recombinantes (procaspases-3, -6, -7, -8, -10) pouvaient être clivées *in vitro* en sa présence (Fernandes-Alnemri et al., 1996). En revanche, la caspase majoritairement activée *in vivo* semble être la caspase-3 (Yang et al., 1998). Un autre substrat important du Granzyme B correspond à la protéine pro-apoptotique BID,

appartenant à la famille Bcl-2. La mitochondrie semble donc jouer un rôle clé dans l'apoptose induite par le Granzyme B (Thiery et al., 2005). Enfin, deux équipes ont récemment découvert un nouveau substrat du Granzyme B. Ils ont montré que l'apoptose induite par un CTL, s'accompagne d'un clivage de l' α -tubuline, indépendant des caspases, suggérant ainsi un rôle du Granzyme B dans le démantèlement du cytosquelette (Adrain et al., 2006; Goping et al., 2006). En résumé, le Granzyme B est capable de tuer sa cellule cible par différentes voies notamment en induisant directement la fragmentation de l'ADN et par le clivage de substrats de mort. Cependant, il semble à l'heure actuelle que le Granzyme active préférentiellement l'apoptose par la voie mitochondriale et le clivage indirect des procaspases effectrices.

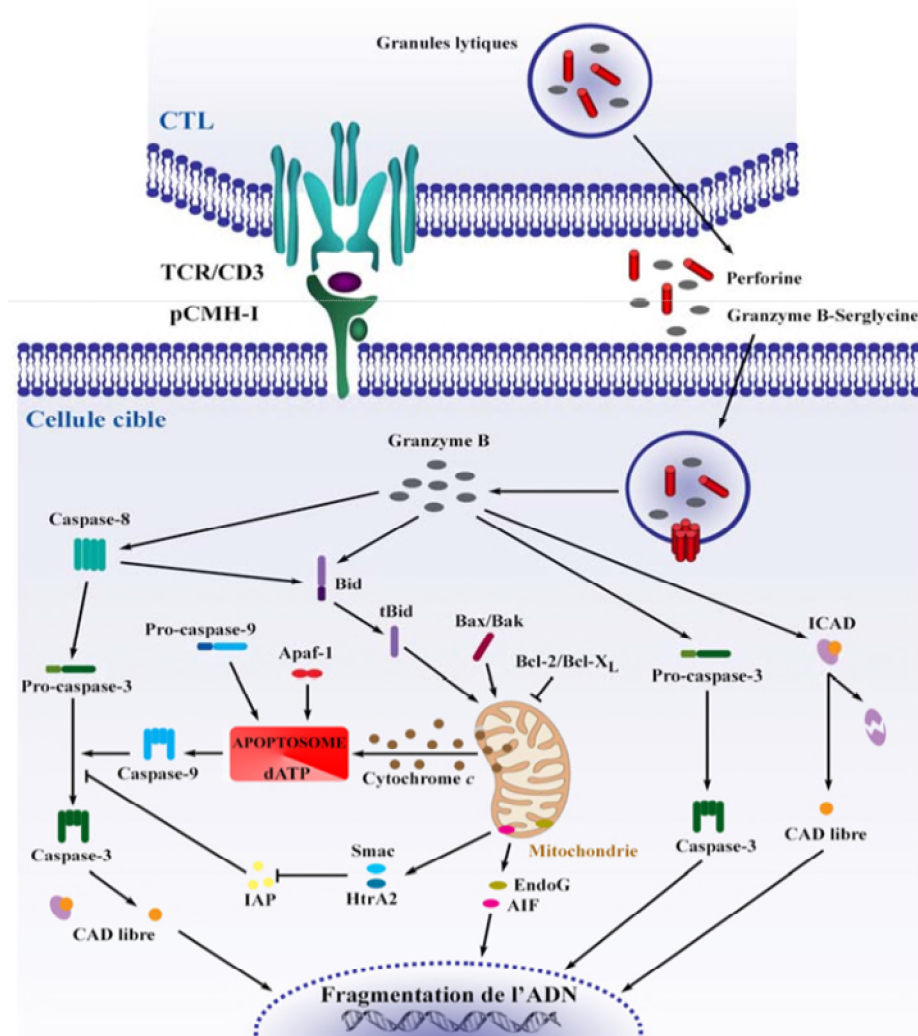


Figure 27: Les différentes voies de mort initiées par le granzyme B

Après reconnaissance par le TCR des complexes pCMH à la surface de la cellule cible, les CTL engagent la voie de lyse perforine/granzyme B par l'exocytose polarisée des granules cytotoxiques. L'exocytose entraîne la libération de la perforine et de complexes macromoléculaires granzyme B-sérglycine dans l'espace intercellulaire. Après leur internalisation dans la cellule cible, le granzyme B est libéré dans le cytoplasme et induit l'apoptose en clivant directement la pro-caspase-3, ou indirectement *via* la caspase-8. Le granzyme B peut également cliver la protéine Bid, ce qui entraîne la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux avec l'action conjointe d'autres membres de la famille Bcl-2 tels que Bax. Leur translocation induit la libération du cytochrome *c* et l'activation subséquente de la caspase-9. Les facteurs Smac/DIABLO et HtrA2/OMI inhibent l'action des IAP, permettant l'activation complète de la caspase-3. Les facteurs AIF et EndoG sont transloqués dans le noyau et induisent la fragmentation de l'ADN. Le granzyme B peut enfin provoquer l'apoptose indépendamment des caspases en clivant des substrats communs aux caspases dont ICAD, induisant la libération de DFF40/CAD, lequel participe à la fragmentation de l'ADN.

IV.2.3 Voie des récepteurs à domaine de mort

Cette voie consiste en l'activation de récepteurs induisant un signal pro-apoptotique, au niveau de la cellule cible, suite à leur engagement avec leurs ligands exprimés par les CTL activés. Certains des membres de la superfamille des TNF-R, connus sous le nom de « récepteurs de mort », ont la particularité de posséder dans leur portion intracellulaire une région conservée appelée « domaine de mort » (DD, Death Domain), un motif protéique d'environ 80 acides aminés nécessaire à la transmission du signal de mort.

La découverte de ces récepteurs de surface a largement contribué à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en place lors de l'induction de la mort cellulaire programmée. Les membres de cette famille sont au nombre de 7: Fas (CD95/APO-1), TNFR1 (p55/CD120a), DR3, DR6, p75NGFR (Nerve Growth Factor Receptor), ainsi que les deux récepteurs de TRAIL, les molécules DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2) (Locksley et al., 2001).

La capacité à induire une mort cellulaire relayée par le récepteur Fas ayant été la première décrite, nous avons choisi cette voie de signalisation pour illustrer l'ensemble des voies des récepteurs de mort (Siegel et al., 2000).

Fas est un récepteur transmembranaire de type I, qui transduit un signal apoptotique pour de nombreux processus biologiques comme le maintien de l'homéostasie du système immunitaire ou la tolérance. Fas est exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules normales, tumorales, comme dans les lymphocytes activés. Le ligand de Fas, FasL (CD95L), est quant à lui, une protéine transmembranaire de type II. Ce ligand est présent sous deux formes : une forme membranaire et une forme soluble résultant du clivage de la forme membranaire par des métalloprotéases (Kayagaki et al., 1995). L'expression de FasL se limite à quelques types cellulaires, tels que les lymphocytes activés et les cellules NK. Son expression sur les cellules tumorales a été décrite mais reste controversée (Igney and Krammer, 2005). La stimulation des homotrimères de CD95 par CD95L, conduit à la formation rapide de microagrégats de récepteurs. La protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) va ensuite être recrutée via une interaction entre le domaine de mort Fas et un domaine de mort homologue situé au niveau de la partie C-terminale de FADD (Chinnaiyan et al., 1995). De plus, FADD contient dans sa partie N-terminale, un second domaine appelé « domaine effecteur de mort » (DED, Death Effector Domain). Celui-ci va permettre le recrutement de pro-caspases initiatrices, notamment la pro-caspase 8 (la forme zymogène de la caspase 8) (Boldin et al., 1996). Le complexe multiprotéique ainsi formé est appelé « complexe de signalisation induisant la mort » ou DISC (Death Inducing Signaling Complex). La formation d'agrégats de Fas et la forte

concentration de pro-caspase 8 au niveau du DISC vont permettre son activation par clivage auto et trans-protéolytique. Le rapprochement des pro-caspases 8 dans le DISC permet leur clivage réciproque et la libération des formes actives de la caspase 8 dans le cytosol, qui vont à leur tour cliver certaines caspases effectrices telles que les caspases 3, 6 et 7.

L'importance de la voie mitochondriale a été récemment démontrée dans la mort induite par Fas. En fait, selon l'utilisation de ces deux voies apoptotiques en aval de Fas, deux types de cellules ont pu être définies (Scaffidi et al., 1998). Alors que les cellules de type I seraient indépendantes d'une activité apoptotique des mitochondries et utiliseraient uniquement une activité directe des caspases, les cellules de type II en seraient dépendantes. Mise à part la quantité de pro-caspase 8 recrutée et clivée au niveau du DISC (faible dans les cellules de type II et importante dans les cellules de type I), aucune différence moléculaire n'a permis à ce jour d'expliquer cette différence de comportement entre les deux types de cellules.

IV.3 Echappement tumoral à l'immuno-surveillance

Il apparaît maintenant clair que le système immunitaire acquiert la capacité à reconnaître et à éliminer les lésions prémalines ainsi que les proto-cancers. Cependant, l'interaction entre les effecteurs immunitaires et les cellules tumorales est dynamique. Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses, caractérisées par une extrême instabilité génétique, subissent une pression de sélection exercée par le système immunitaire, ce qui conduit à l'émergence de variants résistants. Suite à ce processus, connu sous le nom d'« immunoediting » des tumeurs, les cellules tumorales sont capables d'échapper à l'immuno-surveillance. Différents mécanismes d'échappement ont été décrits et peuvent être classifiés comme suit : des mécanismes peuvent agir de façon systémique en limitant le priming et la différenciation des lymphocytes T anti-tumoraux, d'autres agissent au niveau du microenvironnement pour prévenir l'infiltration et l'activation des fonctions effectrices (**Figure 28**).

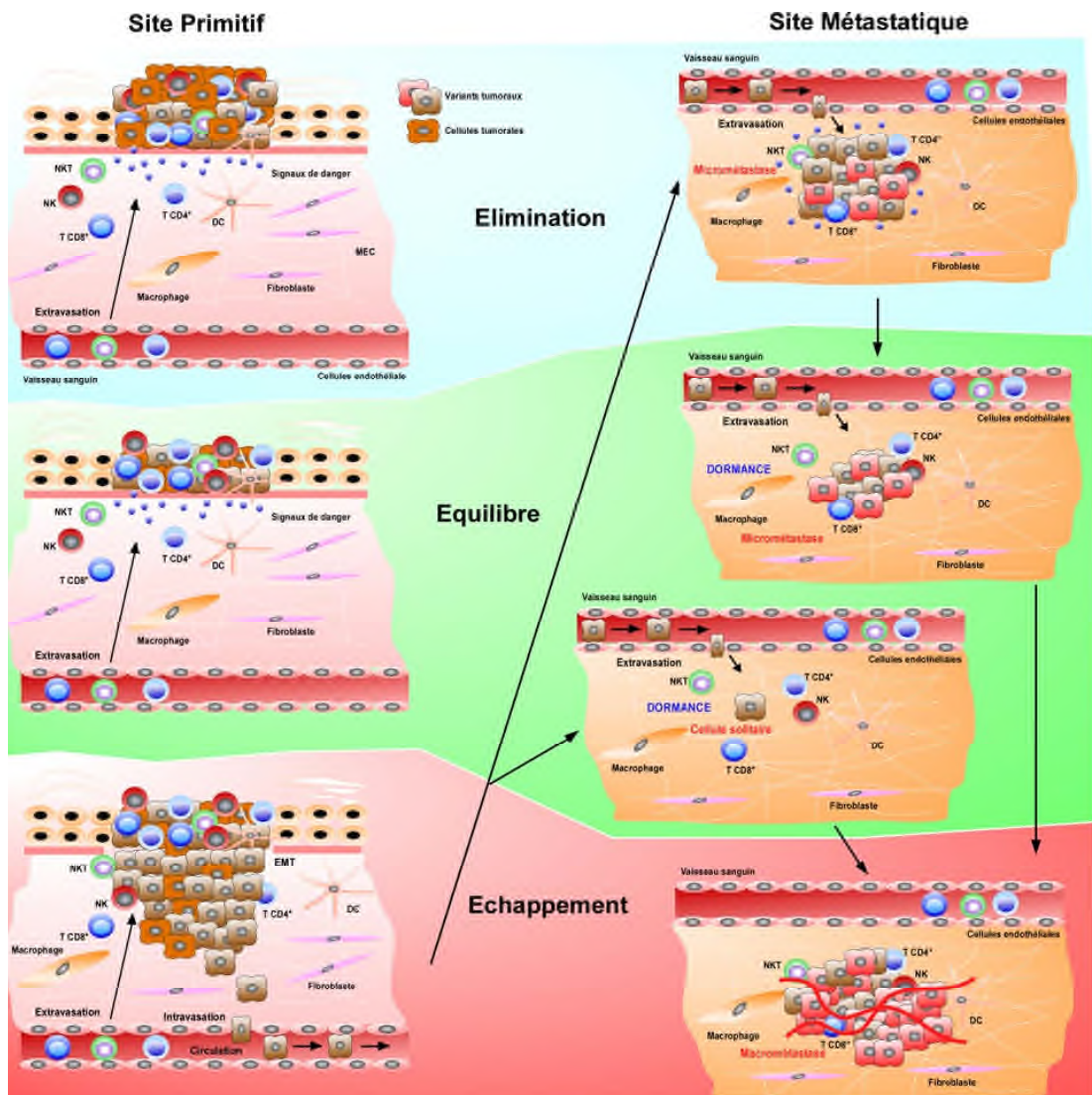


Figure 28: Le concept d'« immunoeediting »

Le concept d'« immunoeediting » est défini par la règle des trois E. L'immunosurveillance entraîne l'élimination des cellules tumorales : les cellules néoplasiques, nouvellement formées au site primitif, sont systématiquement détruites par les acteurs du système immunitaire (NK, NKT, T CD4+, T CD8+). Par ailleurs, le processus de régression des nevi mélanocytaires semble avoir tous les marqueurs de l'immunosurveillance contre les cellules néoplasiques impliquant à la fois les réponses immunitaires innée et adaptative (Cui & Willingham, 2004). Cependant, l'instabilité génétique des tumeurs combinée à la pression de sélection exercée par le système immunitaire conduit à l'émergence de variants résistants. Le système immunitaire peut contenir la croissance tumorale sans toutefois éradiquer les variants résistants durant la phase d'équilibre qui peut être relativement longue. La prolifération incontrôlée de ces variants constitue la phase d'échappement et conduit à l'invasion tumorale et aux métastases. Il a été montré par Knutson et ses coll. que l'*immunoeediting* des cellules tumorales en particulier par la réponse T conduit à une reprogrammation cellulaire assurant la transition EMT et augmentant ainsi leur pouvoir invasif (Knutson et al., 2006; Reiman et al., 2007). Dans un nouveau site de colonisation, ces variants disséminés peuvent être encore éliminés par le système immunitaire qui contient leur prolifération dans une nouvelle phase d'équilibre dite de « dormance » ou encore ces variants peuvent résider en une cellule solitaire quiescente (arrêt en G0-G1). Comme pour le site primitif, l'instabilité génétique des tumeurs, encore plus grande dans les cellules métastatiques, combinée à la pression de sélection exercée par le système immunitaire conduit à l'émergence de variants encore plus résistants et à la formation de macrométastases face à une prolifération incontrôlée.

Dans les premières phases du développement tumoral, il semblerait que l'insuffisance en signaux inflammatoires soit le mécanisme d'échappement dominant. Les stades plus tardifs sont caractérisés par une inflammation chronique avec une infiltration dans le tissu tumoral de diverses cellules inhibitrices telles que les cellules Treg et les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC), accompagnée de la surexpression de protéines telles que B7H-1 par les cellules cancéreuses.

IV.3.1 Mécanismes d'échappement inhérents aux effecteurs T CD8+

IV.3.1.1 Altération du priming des lymphocytes T

Généralement, les cancers ne présentent pas de signaux de danger et ne peuvent donc pas induire de fortes réactions immunitaires. En effet, ces signaux sont essentiels à la maturation des DC et leur absence est associée à une tolérance périphérique (ignorance) induite par une présentation antigénique par des DC immatures (Steinman, 2003). Par ailleurs, il a été rapporté que l'activation constitutive de STAT3 dans les cellules tumorales induit la production de facteurs pléiotropiques inhibant la maturation fonctionnelle des DC et donc la stimulation subséquente des lymphocytes T CD8+ (Wang et al., 2004). Parmi ces facteurs, il a été montré que, outre sa fonction pro-angiogénique, le VEGF produit par les cellules tumorales interfère avec la différenciation et la maturation des DC (Gabrilovich et al., 1996). De la même manière, la production d'IL-6 dépendante de STAT3 inhibe la maturation des DC *in vivo* (Park et al., 2004). Le relargage de gangliosides et mucines (MUC1) par les cellules tumorales dans le microenvironnement contribue également à l'altération de la différenciation des DC (Peguet-Navarro et al., 2003; Rughetti et al., 2005).

Enfin, le TGF- β (Transforming growth factor- β) et l'IL-10, des cytokines immunosuppressives produites par de nombreux types cellulaires (cellules tumorales, cellules Treg, macrophages...), inhibent la maturation des DC, notamment en maintenant un faible niveau d'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 (Geissmann et al., 1999; Strobl and Knapp, 1999).

IV.3.1.2 Inhibition de l'activité lytique des cellules cytotoxiques

De nombreuses études montrent que les lymphocytes spécifiques de tumeurs issus du sang périphérique et infiltrant les tumeurs présentent des différences fonctionnelles importantes. En effet, les TIL spécifiques de tumeur sont rendus tolérants suite à leur entrée dans le microenvironnement tumoral. Ces lymphocytes peuvent présenter un défaut d'expression des granzymes et perforine, et ne produisent pas d'IFN- γ en réponse à une stimulation. Cette tolérance semble réversible puisque les CTL recouvrent leurs fonctions effectrices après une courte période de culture ou en présence d'IL-12 (Broderick et al., 2006). Par ailleurs, les lymphocytes T CD8+ infiltrant les tumeurs peuvent

présenter une activité cytotoxique diminuée due à un défaut de relocalisation du MTOC et par conséquent une absence d'exocytose des granules cytotoxiques. Ce défaut de lyse est associé à un blocage précoce de la voie de signalisation du TCR (Radoja et al., 2001). Suite à la reconnaissance de la cible tumorale, les TIL sont dans l'incapacité de transmettre les signaux en aval de la p56^{lck}, ce qui conduit à un défaut de la mobilisation du MTOC (Koneru et al., 2005). Par ailleurs, les cellules tumorales peuvent induire un défaut de signalisation et de lyse par les TIL, et que la phosphatase SHP-1 serait impliquée dans ce phénomène (Monu and Frey, 2007).

De plus, l'altération de l'activité lytique des CTL peut résulter de l'expression de récepteurs inhibiteurs, tels que CD94/NKG2A et les KIR (Guerra et al., 2002). Par ailleurs, une diminution de l'expression du récepteur activateur NKG2D à la surface des lymphocytes T CD8⁺ a été observée. Celle-ci serait due à la libération d'une forme soluble de MICA par les cellules tumorales induisant l'endocytose et la dégradation de NKG2D (Groh et al., 2002).

IV.3.1.3 Déléition des lymphocytes T

Différents mécanismes pouvant conduire à la délétion des lymphocytes spécifiques de tumeur ont été décrits. Le premier mécanisme repose sur l'induction de l'apoptose des CTL par la voie Fas-FasL. En effet, les cellules tumorales exprimant FasL à leur membrane, ou à la surface de micro-vésicules sécrétées, pourraient engager Fas exprimé par les lymphocytes T activés (Andreola et al., 2002). Cependant, la pertinence de ce modèle de « contre-attaque » *in vivo* est sujette à controverse (Igney and Krammer, 2005). Le second mécanisme de délétion lymphocytaire correspond à l'induction de l'AICD (Activation-Induced Cell Death) par suicide ou fratricide. Il a été montré, chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique, la délétion sélective par AICD de CTL de haute avidité spécifiques de la tumeur (Molldrem et al., 2003).

Les cellules tumorales peuvent également exprimer des molécules inhibitrices, telles que B7- H (PD-L1) et RCAS1, capables de réguler négativement les fonctions des cellules effectrices, notamment en induisant leur apoptose (Nakashima et al., 1999). Enfin, il a été suggéré que les tumeurs métastatiques sont capables d'ingérer les CTL par cannibalisme, ce qui permettrait aux cellules cancéreuses d'échapper à l'immunosurveillance (Lugini et al., 2006).

IV.3.2 Mécanismes d'échappement intrinsèque à la tumeur

IV.3.2.1 *Défaut de présentation antigénique*

La stratégie la mieux documentée permettant à de nombreuses tumeurs d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T est l'altération de l'apprêtement et/ou de la présentation du peptide antigénique par les molécules du CMH. En effet, la présentation de l'Ag par les cellules tumorales peut être altérée suite à une mutation/délétion d'un ou plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans l'apprêtement des peptides, telles que les transporteurs du réticulum TAP1/TAP2 et les sous-unités LMP (Low molecular mass polypeptide) -2 et -7 de l'immunoprotéasome (Marincola et al., 2000). En effet, une diminution d'expression des molécules TAP1/TAP2 dans les cellules tumorales peut être induite par l'IL-10 (Salazar-Onfray et al., 1997; Zeidler et al., 1997). La perte complète ou partielle de l'expression des molécules du CMH peut également résulter de la mutation/délétion du gène codant pour la β 2-microglobuline, ou de la perte sélective d'un haplotype, d'un locus ou d'un allèle HLA (Benitez et al., 1998). Enfin, la perte d'expression des TAA a été décrite comme un mécanisme majeur d'échappement tumoral à la réponse immunitaire, en particulier dans les tumeurs épithéliales.

IV.3.2.2 *Perte de l'expression des molécules d'adhésion*

Comme je l'ai mentionné précédemment, le couple LFA-1/ICAM-1 joue un rôle essentiel dans la formation de la SI et dans la polarisation des granules cytotoxiques (Anikeeva et al., 2005). De ce fait, la diminution de l'expression d'ICAM-1 à la surface des cellules tumorales correspond à un mécanisme majeur d'échappement à l'immuno-surveillance (Passlick et al., 1996). Des études *in vivo* ont montré que la surexpression du gène codant pour ICAM-1 inhibe la croissance tumorale et la survenue de métastases, ce qui est associé à une augmentation significative de la lyse induite par les lymphocytes T (Tachimori et al., 2005). Par ailleurs, il a récemment été montré que la diminution de l'expression d'ICAM-1 permet aux cellules métastatiques de mélanome de résister à la lyse par les CTL en induisant l'activation de la voie de survie PI3K/AKT (Hamai et al., 2008). Cependant, le rôle d'ICAM-1 dans la régulation de la progression tumorale est sujet à controverse. En effet, il semblerait qu'ICAM-1 peut jouer un rôle clé dans l'invasion des cellules cancéreuses épithéliales (Rosette et al., 2005).

La E-Cadhérine, un marqueur des cellules épithéliales, est une protéine suppresseur de tumeur dont l'expression est souvent perdue au cours de la progression des cancers épithéliaux (Vleminckx et al., 1991). Ceci a pour conséquence la diminution de l'adhérence intercellulaire, essentielle à

l'invasion cancéreuse et à la formation des métastases, et participe à l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Perl et al., 1998). Il a été démontré que le TGF- β peut également conduire à l'EMT en induisant indirectement l'expression de différents facteurs de transcription (Snail, Twist, Slug) et en réprimant celle de la E-cadhérine (Polyak and Weinberg, 2009).

IV.3.2.3 Résistance à la voie Perforine/Granzyme

L'inhibition de la signalisation pro-apoptotique correspond à une autre stratégie utilisée par les cellules tumorales pour échapper à la lyse induite par les CTL. D'une part, la serpine nucléocytoplasmique PI-9 (protease inhibitor 9) exprimée par les lymphocytes (Zhang et al., 2006), peut constituer un mécanisme d'échappement utilisé par les cellules tumorales en induisant son expression (Bladergroen et al., 2002). D'autre part, différentes altérations des voies de signalisation de l'apoptose sont observées dans des cellules tumorales. Elles incluent la surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 ou certains membres de la famille des IAP, et la perte d'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bak et Apaf-1.

IV.3.2.4 Expression de molécules inflammatoires

L'acquisition d'évènements génétiques associée ou non à un contexte inflammatoire pro-tumoral (tel que dans le cancer du côlon) conduit à l'activation de différents facteurs de transcription tels que NF- κ B, STAT3 et HIF1 α dans les cellules tumorales. Ces facteurs de transcription coordonnent alors la production de diverses molécules inflammatoires incluant des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines et leurs récepteurs, et la cyclooxygénase 2 (laquelle induit la production de prostaglandines), qui ont pour conséquence de promouvoir la croissance de la tumeur, l'activation de l'angiogénèse et le développement de métastases, mais également le recrutement de cellules immunosuppressives. En effet, un évènement génétique précoce, nécessaire et suffisant pour le développement d'une tumeur humaine, peut provoquer directement la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire (Borrello et al., 2005). A titre d'exemple, l'expression du récepteur aux chimiokines CXCR4 est souvent augmentée dans les cancers humains (suite à une mutation dans le gène suppresseur de tumeur *VHL* ou au réarrangement chromosomique affectant l'oncogène *RET*) et conduit à la formation de métastases. Ou encore, une mutation dans le gène codant pour le TGF- β RII entraîne la production de CXCL5 et CXCL12, deux chimiokines connues pour attirer les MDSC (Yang et al., 2008).

IV.3.3 Le microenvironnement tumoral

Comme évoqué précédemment, une inflammation chronique peut participer au développement de la tumeur. Différents types de cellules peuvent promouvoir la progression tumorale en participant au développement de cet environnement immunosuppresseur pro- tumoral.

IV.3.3.1 Les cellules T régulatrices

Il apparaît aujourd'hui clair que l'immunosuppression induite par les cellules Treg correspond à une stratégie essentielle d'échappement à l'immunosurveillance (Vignali, 2008). Deux types majeurs de cellules Treg ont été identifiés : les cellules Treg naturelles qui se développent dans le thymus et les cellules Treg adaptatives qui se différencient dans les tissus périphériques en présence de TGF- β ou d'IL-10.

Plusieurs mécanismes de suppression utilisés par les cellules Treg ont été décrits et peuvent être classés selon 4 modes d'action: suppression par des cytokines inhibitrices, par l'induction de la cytolysse, par la perturbation métabolique et par la modulation de la maturation et des fonctions des DC :

(1) Les cytokines immunosuppressives, qui apparaissent comme les médiateurs clé des fonctions des cellules Treg, sont l'IL-10 et le TGF- β qui est exprimé soit sous forme soluble soit associé aux membranes. L'IL-35 a récemment été décrite comme étant également une cytokine essentielle à l'activité suppressive des cellules Treg (Collison et al., 2007).

(2) L'équipe de Noelle a été la première à démontrer que les cellules Treg ont la capacité de lyser les cellules effectrices par un mécanisme dépendant du granzyme B (Gondek et al., 2005). Par la suite, Cao et collaborateurs ont mis en évidence la pertinence de ce mécanisme *in vivo* (Cao et al., 2007).

(3) Il a été décrit que les cellules Treg peuvent induire, indépendamment d'un contact cellulaire, l'apoptose des cellules T CD4⁺ en déprivant le milieu en cytokines (IL-2 et IL-7) (Pandiyani et al., 2007). (4) Les cellules Treg naturelles CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ sont capables d'inhiber la maturation et l'activation des DC par un mécanisme faisant intervenir la molécule CTLA-4 (Read et al., 2000). Suite à l'interaction de CTLA-4 avec CD80/CD86, les DC peuvent exprimer IDO, ce qui résulte en la suppression des cellules effectrices (Fallarino et al., 2003).

IV.3.3.2 Les cellules suppressives dérivées des myéloïdes

Les MDSC correspondent à une population hétérogène comprenant des progéniteurs myéloïdes immatures des neutrophiles, monocytes et DC. Ces cellules agissent principalement en inhibant les fonctions anti-tumorales des cellules effectrices. En effet, les MDSC peuvent altérer les fonctions cytotoxiques des CTL en sécrétant différentes cytokines immunosuppressives mais également des dérivés de l'oxygène telles que les peroxy-nitrites. En effet, Nagaraj et collaborateurs ont montré que la nitration des résidus tyrosine du complexe TCR/CD8 entraîne la désensibilisation des CTL aux complexes pCMH- I et donc la diminution de leurs fonctions effectrices. La production de radicaux libres est également associée à une réduction d'expression des molécules associées à la signalisation du TCR telles que la chaîne CD3 ζ (Zea et al., 2005). Par ailleurs, les MDSC contribuent à l'angiogenèse tumorale en sécrétant la métalloprotéinase MMP9 et en se différenciant en cellules endothéliales-like. Au sein du microenvironnement tumoral, les MDSC peuvent se différencier en macrophages associés aux tumeurs (TAM), lesquels présentent un phénotype et des fonctions différentes (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

IV.3.3.3 Les macrophages associés aux tumeurs

L'accumulation des TAM est généralement corrélée à un mauvais pronostic chez les patients (Bingle et al., 2002). Les cellules tumorales ainsi que les cellules Treg sont capables de polariser sélectivement les TAM vers le phénotype immunosuppresseur M2 par la production de G-CSF, d'IL-10 et de TGF- β (Tiemessen et al., 2007). Les TAM-M2 jouent alors un rôle essentiel dans la progression tumorale en promouvant la croissance tumorale, l'angiogénèse et la formation de métastases (Condeelis and Pollard, 2006).

IV.3.3.4 Les cellules NKT

Bien que les cellules NKT soient considérés comme des acteurs majeurs des réponses immunes anti-tumorales (Liu et al., 2005), des études récentes ont montré que ces cellules pourraient également exercer une activité immunosuppressive (Moodycliffe et al., 2000; Terabe et al., 2000). En effet, les NKT issus de patients atteints de cancer de la prostate présentent un profil de sécrétion de type Th2 (production d'IL-4, mais pas d'IFN- γ) qui serait impliqué dans la suppression de la réponse anti-tumorale (Exley et al., 2001). Une étude récente a permis de montrer que les cellules NKT V α 14J α 18- (type II) sont responsables de la suppression de l'immunité anti-tumorale alors que les cellules NKT V α 14J α 18+ (type I) exercent un effet inverse (Terabe et al., 2005). Enfin, en présence de cellules NKT, les DC sécrètent plus d'IL-10 et perdent la capacité à produire de l'IL-12.

IV.3.3.5 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B peuvent inhiber les réponses anti-tumorales de type Th1, en renforçant simultanément les fonctions pro-tumorales des cellules effectrices de type Th2 (Tan and Coussens, 2007). Alors que la présence d'Ac dirigés contre des TAA est souvent détectée chez les patients atteints de cancer, leur production ne confère pas nécessairement de protection et elle est souvent corrélée avec un mauvais pronostic. Il a été suggéré que le dépôt de complexes immuns serait impliqué dans l'établissement d'une inflammation chronique favorisant le développement de la tumeur (de Visser et al., 2005).



Objectifs des travaux

Il est clair que les carcinomes provenant de tissus épithéliaux progressent à des états de malignité très élevés, se traduisant par l'invasion locale et des métastases à distance. Les cellules cancéreuses associées développent alors des altérations au niveau morphologique, au niveau des jonctions cellulaires et au niveau de leur adhésion à la matrice extracellulaire. L'altération la mieux caractérisée implique la perte de la E-cadhérine, une molécule clé de l'adhésion cellulaire et marqueur des cellules épithéliales, par les cellules de carcinome. Tandis que l'expression accrue de la E-cadhérine est connue comme antagoniste de l'invasion et des métastases, la diminution de son expression potentialise ces phénotypes (Berx and van Roy, 2009; Cavallaro and Christofori, 2004). La compréhension des mécanismes de répression de la E-Cadhérine a été largement détaillée durant cette dernière décennie. En effet, il a été démontré que plusieurs facteurs de transcription peuvent directement réprimer l'expression du gène codant pour la E-cadhérine, privant ainsi les cellules épithéliales néoplasiques de ce suppresseur clé de la motilité et de l'invasion (Peinado et al., 2007). Parmi ces facteurs transcriptionnels, on peut citer Snail, Slug, Twist, et ZEB1, qui orchestrent le processus de migration lié à l'embryogenèse et au processus métastatique nommé Transition Épithélio-Mésenchymateuse (EMT) (Micalizzi et al., 2010; Yang and Weinberg, 2008). Cette dernière joue un rôle important dans la progression tumorale et en particulier dans l'acquisition d'un potentiel métastatique au cours duquel les cellules néoplasiques développent des propriétés mésenchymateuses. De plus, l'EMT s'accompagne d'une résistance accrue aux stimuli apoptotiques et à la chimiothérapie (Klymkowsky and Savagner, 2009; Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009), mais l'effet des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sur les cellules ayant subi l'EMT demeure inconnu.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon projet de thèse dont les principaux objectifs consistent, dans un premier temps, en l'étude de l'impact de l'EMT induite dans un modèle cellulaire de cancer du sein sur l'immunogénicité tumorale vis-à-vis des lymphocytes TCD8⁺; et dans un second temps, en la recherche des mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction d'une altération de la réponse cytotoxique spécifique suite à l'activation du processus d'EMT.

Globalement, ces travaux ont pour but une meilleure compréhension des mécanismes qu'adoptent les cellules tumorales pour échapper à l'activité des CTLs anti-tumoraux. Ceci pourrait permettre aux thérapies anticancéreuses d'être plus ciblées afin d'optimiser la réponse anti-tumorale.



Modèles expérimentaux

Dans le cadre de cette étude, nous disposons d'un modèle expérimental comprenant les lignées cellulaires de cancer du sein suivantes (**Figure 29**):

La lignée parentale MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7), en référence à l'Institut de Detroit où la lignée fut établie -au septième essai-, en 1973, par Herbert Soule et collègues. Cette lignée a été établie en culture *in vitro* à partir d'un épanchement pleural prélevé chez une patiente de 69 ans atteinte d'un cancer du sein métastatique. Cette patiente est décédée en 1970. En dépit de l'origine métastatique de cette lignée, elle se caractérise par un phénotype très épithélial et une faible capacité d'invasion.

Le premier projet de cette thèse repose sur le modèle cellulaire composé de la lignée parentale MCF7 et de ses dérivées 2101 provenant d'une sélection de variants résistants au traitement des MCF7 par le TNF- α , de la lignée MCF7 transfectée avec un plasmide codant pour la protéine Snail sous une forme constitutivement active (MCF7-Snail 6SA) et des MCF7 transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Snail sauvage (MCF7-Snail WT).

Le deuxième projet de cette thèse repose sur le modèle cellulaire établi dans l'unité INSERM U938 par le Dr. Sabbah. Il est composé de la lignée parentale MCF7, de cette dernière transfectée avec le shRNA (short hairpin RNA) ciblant le gène WISP2 (MCF7-shWISP2) et des MCF7 transfectées avec le shcontrôle (MCF7-shScrambled).

Les caractéristiques de l'ensemble de ces lignées quant à la présence des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone, à l'amplification du gène ERBB2 et au sous-type de cancer du sein auquel chacune appartient sont discutées dans la partie « discussion générale ».

Ces deux modèles ont fait l'objet d'investigations antérieures (Zhou et al., 2004; Ouelaa-Benslama et al., 2012; Fritah et al., 2008; Sabbah et al., 2011). Néanmoins, l'étude de l'effet de l'induction de l'EMT dans ces modèles sur la susceptibilité à la lyse spécifique n'a jamais été entreprise.

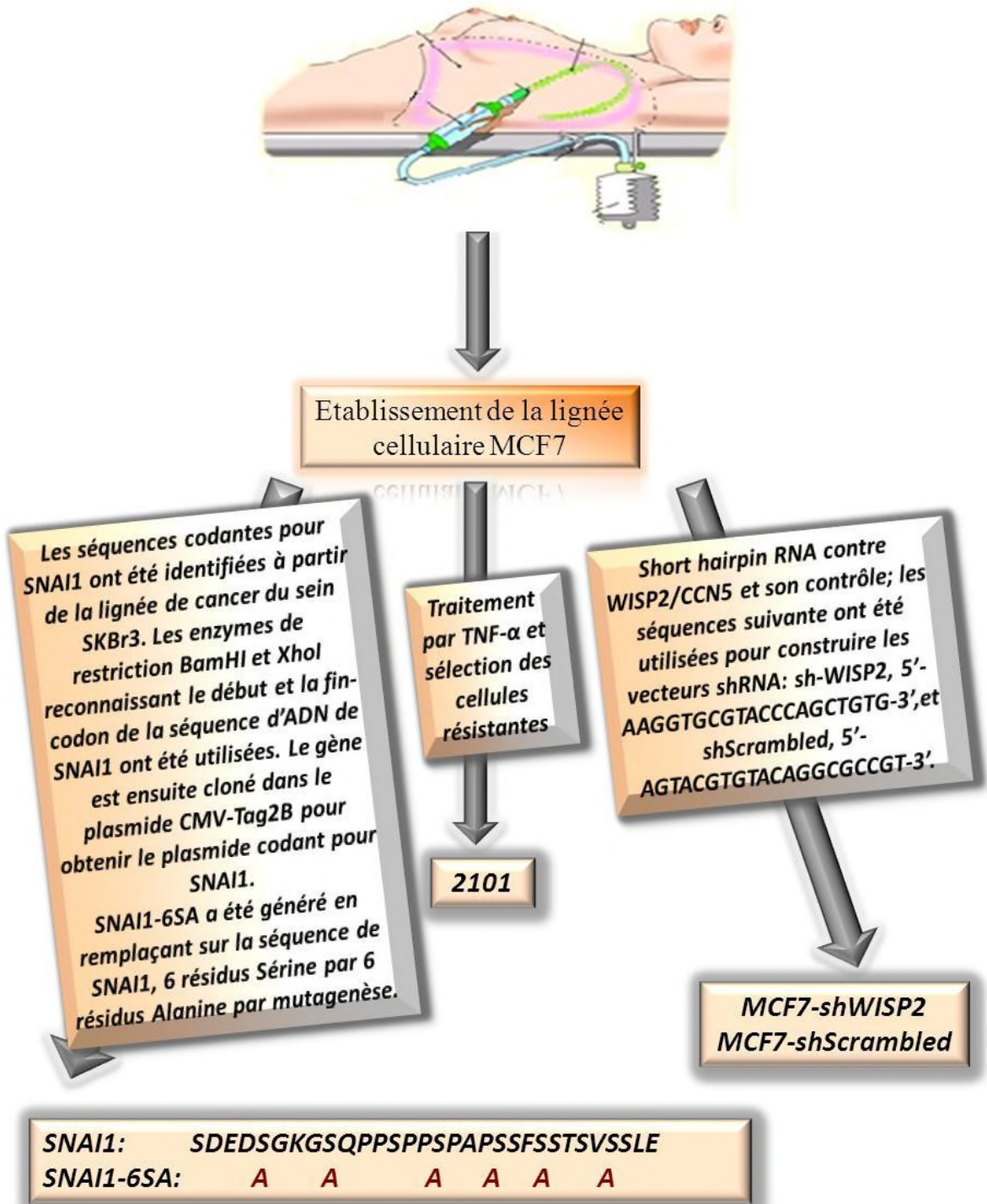


Figure 29: Modèles expérimentaux



Résultats

Partie I : Akalay I *et al.*, 2013a



Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction
in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis

Cancer Research 73, 2418-2427

Priority Report

Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Autophagy Induction in Breast Carcinoma Promote Escape from T-cell-Mediated Lysis

Intissar Akalay¹, Bassam Janji³, Meriem Hasmim¹, Muhammad Zaeem Noman¹, Fabrice André², Patricia De Cremoux⁴, Philippe Bertheau⁵, Cécile Badoual⁶, Philippe Vielh⁷, Annette K. Larsen⁸, Michèle Sabbah⁸, Tuan Zea Tan⁹, Joan Herr Keira¹¹, Nicole Tsang Ying Hung¹¹, Jean Paul Thiery^{9,10,11}, Fathia Mami-Chouaib¹, and Salem Chouaib¹

Abstract

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) mediates cancer cell invasion, metastasis, and drug resistance, but its impact on immune surveillance has not been explored. In this study, we investigated the functional consequences of this mode of epithelial cell plasticity on targeted cell lysis by cytotoxic T lymphocytes (CTL). Acquisition of the EMT phenotype in various derivatives of MCF-7 human breast cancer cells was associated with dramatic morphologic changes and actin cytoskeleton remodeling, with CD24⁻/CD44⁺/ALDH⁺ stem cell populations present exhibiting a higher degree of EMT relative to parental cells. Strikingly, acquisition of this phenotype also associated with an inhibition of CTL-mediated tumor cell lysis. Resistant cells exhibited attenuation in the formation of an immunologic synapse with CTLs along with the induction of autophagy in the target cells. This response was critical for susceptibility to CTL-mediated lysis because siRNA-mediated silencing of *beclin1* to inhibit autophagy in target cells restored their susceptibility to CTL-induced lysis. Our results argue that in addition to promoting invasion and metastasis EMT also profoundly alters the susceptibility of cancer cells to T-cell-mediated immune surveillance. Furthermore, they reveal EMT and autophagy as conceptual realms for immunotherapeutic strategies to block immune escape. *Cancer Res*; 73(8); 2418–27. ©2013 AACR.

Introduction

CD8⁺ T cells play a crucial role in the host defenses against malignancies in both mice and humans (1). The identification of tumor-associated antigens (TAA) recognized by CD8⁺ T lymphocytes has permitted potentiation of specific immune responses in immunotherapy strategies. Nevertheless, despite the expression of TAAs, tumor eradication by the immune

system is often inefficient (2), which accounts for the disappointing clinical activity of most cancer vaccines (3). Extensive studies have shown that tumor cells themselves play a crucial role in modulating the host immune response, such that they maintain their functional disorder and evade immune surveillance (4). In this regard, it has been suggested that tumor cell growth *in vivo* is not only influenced by cytotoxic T lymphocyte (CTL) tumor cell recognition but also by tumor susceptibility to cell-mediated death (5). While the resistance of tumor cells to T-cell-mediated cytotoxicity remains a major impediment for cancer immunotherapy, its molecular basis is poorly understood.

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a fundamental mechanism governing embryonic morphogenesis that has, intriguingly, been documented to operate in carcinomas, with the transition from an epithelial carcinoma to a mesenchymal-like state potentially linked with increased stemness, therapeutic resistance, and escape from immune surveillance (6). Snail 1 (SNAIL) is a transcription factor that induces EMT by directly repressing E-cadherin expression (7). We previously described the morphologic changes in lung cell carcinoma as a mechanism of tumor escape that was partly involved in the resistance of tumor cells to T-cell-mediated cytotoxicity (8).

Recently, autophagy has been proposed to play an important role in tumor progression and in the promotion of cancer cell death (9). Furthermore, it is shown that EMT involves the activation of several important pathways that help tumors

Authors' Affiliations: ¹Unité INSERM U753, Institut de Cancérologie Gustave Roussy; ²U981 INSERM, Institut Gustave Roussy, Villejuif; ³Laboratory of Experimental Hemato-Oncology, Department of Oncology, Public Research Center for Health (CRP-Sante), Luxembourg City, Luxembourg; ⁴Molecular Pharmacology Unit, Institut Curie; ⁵Service d'anatomie pathologique, Hôpital Saint-Louis; ⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d'anatomo-pathologie, Hôpital Européen Georges Pompidou; ⁷Laboratoire de Recherche Translationnelle-module d'histocytologie; ⁸Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM U938 and Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Recherche Translationnelle-module d'histocytologie, Paris France; ⁹Cancer Science Institute of Singapore, ¹⁰Biochemistry Department, National University of Singapore; and ¹¹Institute of Molecular and Cell Biology, A*STAR, Singapore

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Salem Chouaib, Unité INSERM U753, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif Cedex 94805, France. Phone: 331-4211-4547; Fax: 331-4211-5288; E-mail: chouaib@igr.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2432

©2013 American Association for Cancer Research.

survive and evolve into highly invasive and metastatic variants (10). However, the relationship between EMT and autophagy-induced cell survival is unknown. Although evidence has suggested that epithelial plasticity may interfere with tumor susceptibility to cytotoxic agents, the functional consequences of EMT on T-cell-mediated cytotoxicity remain undetermined.

In this study, we sought to examine the influence of EMT on CTL-mediated lysis and its associated mechanisms and to ascertain whether EMT-induced cell plasticity could interfere with tumor cell susceptibility to this lysis. We show that EMT has functional consequences on target recognition and lysis, and we identify EMT-induced autophagy as a novel mechanism by which tumor cells regulate CTL reactivity and impede their cytotoxic activity.

Materials and Methods

T-cell clone, tumor cell lines, and culture conditions

The T-cell receptor (TCR)-V β 13.6⁺ Heu33 CTL clone was derived from a patient's Heu tumor as described (11). MCF-7 and derivatives were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM):F12 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco-BRL), 1 mmol/L sodium pyruvate (Life Technologies), and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The MCF-7 breast cancer cell line was transfected with wild-type Snail (SNAI1), constitutively activated Snail (SNAI1-6SA) generated by mutation of Ser6 to Ala and with an empty vector, as described (12). Transfected cells were cultured in complete medium supplemented with 500 μ g/mL of G418 (Life Technologies). TNF-resistant cells (2101) were derived from the TNF-sensitive human breast carcinoma MCF-7 cell line after continuous exposure to increasing doses of recombinant TNF- α (13).

Cell morphology, actin cytoskeleton, and EMT marker staining

Cell morphology images were acquired using $\times 20$ objective by phase-contrast microscopy (Leica Microsystems). Actin filaments were stained by Alexa Fluor 488-coupled Phalloidin. EMT markers were stained with indicated antibodies and nuclei with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; dihydrochloride; Life Technologies). Cells were cultured in IBIDI chambers (IBIDI) and fixed with 3% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. Cells were then permeabilized with 0.4% Triton X-100 and stained with indicated antibodies. Cells were analyzed with a Zeiss laser scanning confocal microscope, LSM-510 Meta (Carl Zeiss) and processed by LSM Image Examiner software (Carl Zeiss).

Western blotting

Adherent cells were lysed on the plate with lysis buffer (62.5 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 2 mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride, 25 μ mol/L leupeptin, 5 mmol/L benzamide, 1 μ mol/L pepstatin, and 25 μ mol/L aprotinin). Cells lysates were resolved by SDS-PAGE electrophoresis (30 μ g/sample) and transferred onto nitrocellulose membranes. After incubation

in blocking buffer, the membranes were probed overnight at 4°C with the primary antibodies. The labeling was visualized using peroxidase-conjugated secondary antibodies and with an ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech). Primary antibodies against SNAI1, E-cadherin and LC3B were from Cell Signaling. Antibodies against SNAI2 and Twist were from Abcam. Antibodies against vimentin, beclin 1, and N-cadherin were from Santa Cruz Biotechnologies.

Data preprocessing of the breast cancer cell line panel

Two large breast cancer cell line datasets were established using the Affymetrix U133A or U133plus2 platform: E-TABM-157 ($n = 51$ samples corresponding to 51 cell lines) and GSE15026 ($n = 30$ samples corresponding to 19 cell lines) were downloaded from Array Express and Gene Expression Omnibus (GEO), respectively. Robust Multichip Average (RMA) normalization was conducted for each dataset. The normalized data were combined with the dataset from the present study ($n = 8$ samples from the parental MCF-7 cells, 2 Snail-expressing cell lines, and one TNF- α -resistant MCF cell line variant), and subsequently standardized using ComBat (14) to remove batch effect. The standardized data yielded a dataset of 89 samples derived from 73 cell lines.

Estimation of EMT score

An EMT scoring method was developed using ovarian carcinoma cell line expression profiling. The first step was to establish an EMT signature comparing profiles of *CDH1*- with *CDH2*-expressing cell lines using a binary regression method (BinReg; ref. 15). In the second step, the BinReg ovarian cancer EMT signature was applied to breast cancer cell lines to predict their EMT status. In the third step, the top 25% (~ 20 samples) with the highest probabilities for the epithelial or mesenchymal phenotype were used to obtain epithelial- or mesenchymal-specific gene lists for the breast cancer cell lines using Significance Analysis of Microarray (SAM) q value of 0 and receiver operating characteristic (ROC) value of 0.85. In the fourth step, single-sample gene set enrichment analysis (GSEA; ref. 16) was used to compute the enrichment score of a cell line based on the expression of the breast cancer cell line-specific epithelial or mesenchymal signature genes. EMT score is defined as the normalized subtraction of the mesenchymal from epithelial enrichment score. The EMT score is a precise estimate of the cell line's status as an epithelial or mesenchymal phenotype. A higher or lower EMT score indicates that the cell line exhibits a more mesenchymal or epithelial phenotype, respectively (the detailed method is submitted for publication, Tan, Huang, Thiery and Mori and colleagues).

Cytotoxicity experiments and TNF- β production assay

The cytotoxic activity of the CTL clone was measured by a conventional 4-hour ⁵¹Cr release assay. Several effector:target (E:T) ratios were used on 1,000 target cells per well. Supernatants were then transferred to LumaPlate-96 wells (Perkin-Elmer), dried down, and counted on a Packard TopCount NXT. Percentage of specific cytotoxicity was calculated conventionally.

TNF- β release was detected by measuring the cytotoxicity of the culture supernatants on the TNF-sensitive WEHI-164c13 cells with an MTT colorimetric assay, as previously described (17).

Confocal microscopy analysis of immunologic synapse assembly

Tumor cells and CTLs were cocultured for 30 minutes at a 1:2 ratio. Cells were then fixed with 3% paraformaldehyde for 10 minutes and permeabilized with 0.1% (w/v) SDS solution in PBS for 10 minutes, followed by blocking with FCS 10% (v/v) solution in PBS for 20 minutes. Fixed cells were stained with an anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (mAb) 4G10 clone (dilution 1:100, Millipore Corp.) and then with a secondary mAb coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen) for 30 minutes. Cell nuclei were stained with TO-Pro 3 iodide (2 μ mol/L) for 15 minutes. Analysis was conducted by a Zeiss laser scanning confocal microscope (LSM-510) and using LSM Image Examiner software (Zeiss). Conjugates formed between T cells and tumor cells were scored by visual counting. Mean number of active synapses/field were counted in 10 different fields per cell line randomly selected at $\times 40$ magnifications. Quantification of phosphotyrosine intensity was conducted using the region measurement function of ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

Autophagosome detection and autophagy flux analysis

Cells were transiently transfected with 5 μ g of LC3 cDNA fused with GFP (kindly provided by N. Mizushima, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendation. After 48 hours, cells were cultured in IBIDI chambers (Biovalley), and the formation of autophagosomes was assessed by Zeiss laser scanning confocal microscopy LSM-510 Meta. The autophagy flux was assessed by treatment of cells for 6 hours with chloroquine (40 mmol/L), an inhibitor of the lysosomal activity, and the accumulation of the lipidated form of LC3 (LC3-II) was analyzed by Western blotting using an anti-LC3 Ab.

Immunohistochemical staining for Snail 2 and ATG5 expression

Mesenchymal and autophagic cells, respectively, were detected by SNAI2 and ATG5 staining on human breast cancer sections. Immunohistochemistry was conducted as previously described (18). The samples were incubated with mAbs against SNAI2 (Abcam) and ATG5 (MBL Japan). The signal was revealed with the DAB HistoMouse-Max Kit (Zymed Laboratories Inc.).

siRNA targeting of autophagy gene BECN1

Autophagy-defective cells were generated by transfection with *beclin1* (BECN1) siRNA. Briefly, cells were transfected by electroporation with 50 nmol of siRNA-targeting human *beclin1* (Qiagen). Luciferase (Luc) siRNA was used as a negative control. The silencing of *beclin1* was assessed by Western blotting 48 hours after transfection using appropriate antibodies.

Data mining of microarray results

Significantly regulated genes in SNAI1 or SNAI1-6SA transfectants as compared with the parental MCF-7 cells were subjected to Ingenuity Pathway Analysis (IPA). The Ingenuity database was used to identify EMT-regulated genes, whereas the dedicated autophagy database was used to extract genes involved in and/or related to the autophagic process (19, 20). IPA software was used to build a connection between EMT and the autophagy-regulated genes.

RNA isolation and SYBR green real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from the samples using TRIzol (Invitrogen). A total of 1 μ g RNA was converted into cDNA by using Taqman Reverse transcription reagent (Applied Biosystems), and mRNA levels were quantified by SYBR-GREEN qPCR method (Applied Biosystems). Relative expression was calculated by using the comparative C_T method ($2^{-\Delta C_T}$).

Flow cytometry and ALDH activity

Cells were harvested with 0.025% EDTA and double-stained with CD44 (PE) and CD24 (APC) mAbs (both from Miltenyi Biotec). Labeled cells were analyzed on a BD FACSCalibur (BD Biosciences).

ALDH activity was analyzed using the Aldefluor Assay Kit from StemCell Technologies, Inc. and following manufacturer's recommendations.

Statistical analyses

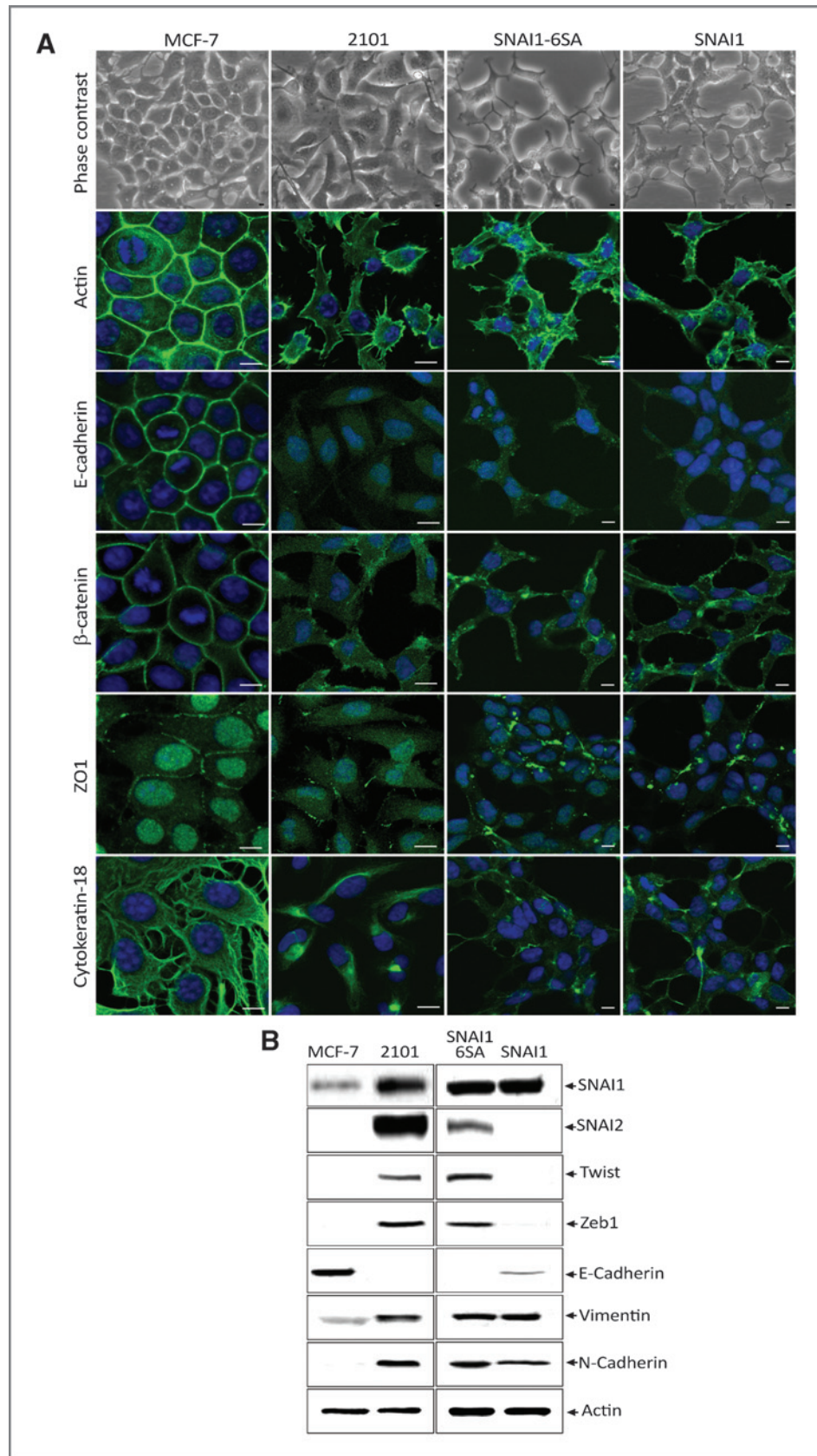
Data were analyzed with GraphPad Prism. The Student *t* test was used for single comparisons. Data were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results and Discussion

2101, SNAI1, and SNAI1-6SA cells display similar EMT phenotypes, but distinct EMT indices and stemness markers

We characterized the EMT phenotype of MCF-7-derived cells that have undergone EMT following the overexpression of either wild-type Snail (SNAI1) or constitutively active Snail (SNAI1-6SA) or following the acquisition of TNF- α resistance (2101 cells). Parental MCF-7 cells exhibited a characteristic cobblestone epithelial organization with E-cadherin, β -catenin, and ZO-1 immunolocalization at cell-cell contacts that were also closely associated with cortical actin microfilaments. MCF-7 cells also expressed cytokeratin intermediate filaments, some of which were localized at sites of desmosomes. In contrast, SNAI1 and SNAI1-6SA cells displayed a spindle-like morphology with filopodia and were characterized by reduced cell-cell contacts (Fig. 1A). 2101 cells exhibited an even more extensive mesenchymal phenotype with actin microfilaments in the filopodia and lamellipodia (Fig. 1A). Immunofluorescence analysis showed a dramatic downregulation of the epithelial markers E-cadherin, β -catenin, ZO-1, and cytokeratin 18 in the MCF-7-derived cell lines undergoing EMT (Fig. 1A). These morphologic changes were also associated with a gain of mesenchymal markers. Indeed, SNAI1 transfection

Figure 1. Differential expression of EMT markers in MCF-7 cell line and derived subclones. A, phase-contrast images showing the morphology of epithelial MCF-7 and mesenchymal derivative clones (2101, SNAI1-6SA, and SNAI1). Immunofluorescence staining of actin and epithelial markers (E-cadherin, β -catenin, ZO-1, and cytokeratin 18). Nuclei were stained with DAPI. B, Western blot analysis of the expression of EMT markers using the indicated antibodies.



Akalay et al.

induced the expression of N-cadherin and vimentin and decreased the expression of E-cadherin. SNAI1-6SA cells expressed SNAI2, ZEB1, but not E-cadherin (Fig. 1B). Thus, constitutively activated SNAI1-6SA cells are likely to exhibit a more pronounced mesenchymal-like phenotype than SNAI1 cells. Figure 1B also shows that 2101 cells exhibited a more complete EMT phenotype, with the expression of SNAI2, Twist, ZEB1, vimentin, and N-cadherin.

To provide further evidence for the EMT features of these cancer cell lines, we developed an EMT scoring method using gene expression profiling. As shown in Fig. 2A, an EMT score of -0.84 ± 0.008 was determined for the parental MCF-7 cells, indicating its well-known epithelial phenotype. As expected, SNAI1 cells acquired a mesenchymal-like phenotype; but the EMT score of -0.16 ± 0.007 instead indicated an intermediate phenotype. Similarly, the SNAI1-6SA cells were found to have an EMT score of -0.11 ± 0.01 . In contrast, the 2101 cells scored a significantly higher 0.6 ± 0.02 , which cannot be fully related to the Snail signature (60% concordance, data not shown) as other signatures, such as ZEB1, could contribute to this EMT score. This result suggests that 2101 cells acquire EMT by additional mechanisms that involve 2 or more transcriptional repressors of E-cadherin. It is worth noting that the acquisition of a resistance to TNF- α and the high EMT score in these 2101 cells suggest the existence of a level of complexity in the EMT process in which multiple molecules act together to mediate EMT, rather than the master regulators acting on their own. This indicates that EMT can be induced to varying degrees in epithelial cells to acquire intermediate mesenchymal-like states but also to display additional functional features. In this regard, Kim and colleagues have recently reported that p53 regulates EMT through miRNAs targeting ZEB1 and ZEB2 (21). It should be noted that 2101 cells display a mutated p53 and a loss of its transcriptional activity (13), which may, at least in part, account for the acquisition of EMT by these cells.

On the basis of the previously reported induction of stem cell markers following induction of EMT (22), we next determined the relationship between EMT score and stem cell characteristics such as CD44^{high}/CD24^{low} profile and high ALDH activity. As shown in Fig. 2B, a, 2101 cells were equally partitioned into a CD44^{high} and a CD44^{low} populations as compared with MCF-7 cells, which displayed only a CD44^{low} profile. Furthermore, measurements of ALDH activity showed a spectrum of high ALDH activity, with levels increasing in parallel to the estimated EMT score in MCF-7, SNAI1, SNAI1-6SA, and 2101 cells (Fig. 2B, b). Indeed, Fig. 2B(ii) shows that 2101 cells harbored the highest level of ALDH activity (92% ALDH⁺) and MCF-7 cells the lowest (56% ALDH⁺). Additional experiments showed an increased exclusion of the Hoechst dye, an increased expression of the stem cell markers SOX2, OCT4, NANOG, as well as spheroid formation and tumorigenicity in EMTed subclones (Supplementary Data S1). Consistent with these results, ZEB1 has been reported to link EMT activation and maintenance of stemness by suppressing stemness-inhibiting miRNAs (23). These results suggest that our EMTed clone exhibit stem cell-like properties.

Impairment of tumor cell susceptibility to CTL-mediated lysis upon EMT

To examine the functional consequences of target cell plasticity on specific T-cell-mediated lysis, we used the Heu33 CTL clone, which is able to lyse the parental MCF-7 cell line in an HLA-A2-restricted manner (11). As shown in Fig. 3A, a significant decrease in EMTed target cell susceptibility to CTL-mediated killing was observed. To determine whether impairment of T-cell-mediated lysis correlated with defects in recognition of Snail1-expressing cells, we examined conjugate formation between Heu33 CTL and MCF-7 cells or their derivative clones by confocal microscopy. The results shown in Fig. 3B, a indicate that MCF-7 parental cells were able to form stable conjugates with the Heu33 clone and could induce T-cell activation, as shown by an increase in tyrosine phosphorylation at the cell contact area. In contrast, a significant decrease of phosphotyrosine staining was detected when the CTL clone was cultured with mesenchymal cells (2101, SNAI1, and SNAI1-6SA), as confirmed by statistical analysis (Fig. 3B, b). The decrease in phosphotyrosine accumulation at the contact zone formed between mesenchymal and CD8⁺ T cells reveals an alteration in the signaling events occurring at the immune synapse that may be potentially due to the expression of Snail. When reported as the percentage of active conjugates, a significant decrease in conjugates with phosphotyrosine accumulation was observed between the mesenchymal cells and CD8⁺ T lymphocytes as compared with those observed between parental MCF-7 cell line and CTLs (Fig. 3B, c). As shown in Fig. 3C, mesenchymal tumor cells were less efficient in triggering cytokine production by CTL clone, indicating an influence of the EMT phenotype acquisition on T-cell reactivity.

Despite our increasing knowledge about tumor escape mechanisms, the involvement of EMT in tumor resistance to CTL-mediated killing and, in particular, how it counteracts effector T-cell responses has not been well documented. Here, we provide evidence that the acquisition of an EMTed phenotype results in the inhibition of target cell susceptibility to TCR-dependent lysis. In a previous study, we showed that resistance may be associated with morphologic changes (8). Our findings confirm that understanding the tumor behavior, especially in the context of tumor cell plasticity, and its interplay with effector cells will be key determinants in providing a rational approach to tumor immunotherapy. Accordingly, the various strategies aimed at the induction of antitumor cytotoxic responses should therefore consider the morphologic changes described in this report as an antitumor mechanism of tumor escape that is partly involved in resistance of cancer cells to CTL-mediated cytotoxicity.

EMT-induced tumor cell resistance to CTL-mediated lysis involves the induction of autophagy

We next asked whether EMT-dependent impairment of target cell susceptibility to CTL-mediated killing is associated with the activation of autophagy. Cells were transfected with GFP-LC3 to monitor the formation of autophagosomes. While no autophagosomes were detected in parental and control MCF-7 (MCF-7 and MCF-7 empty vector), the formation of autophagosomes (green dot-like structures) was observed in

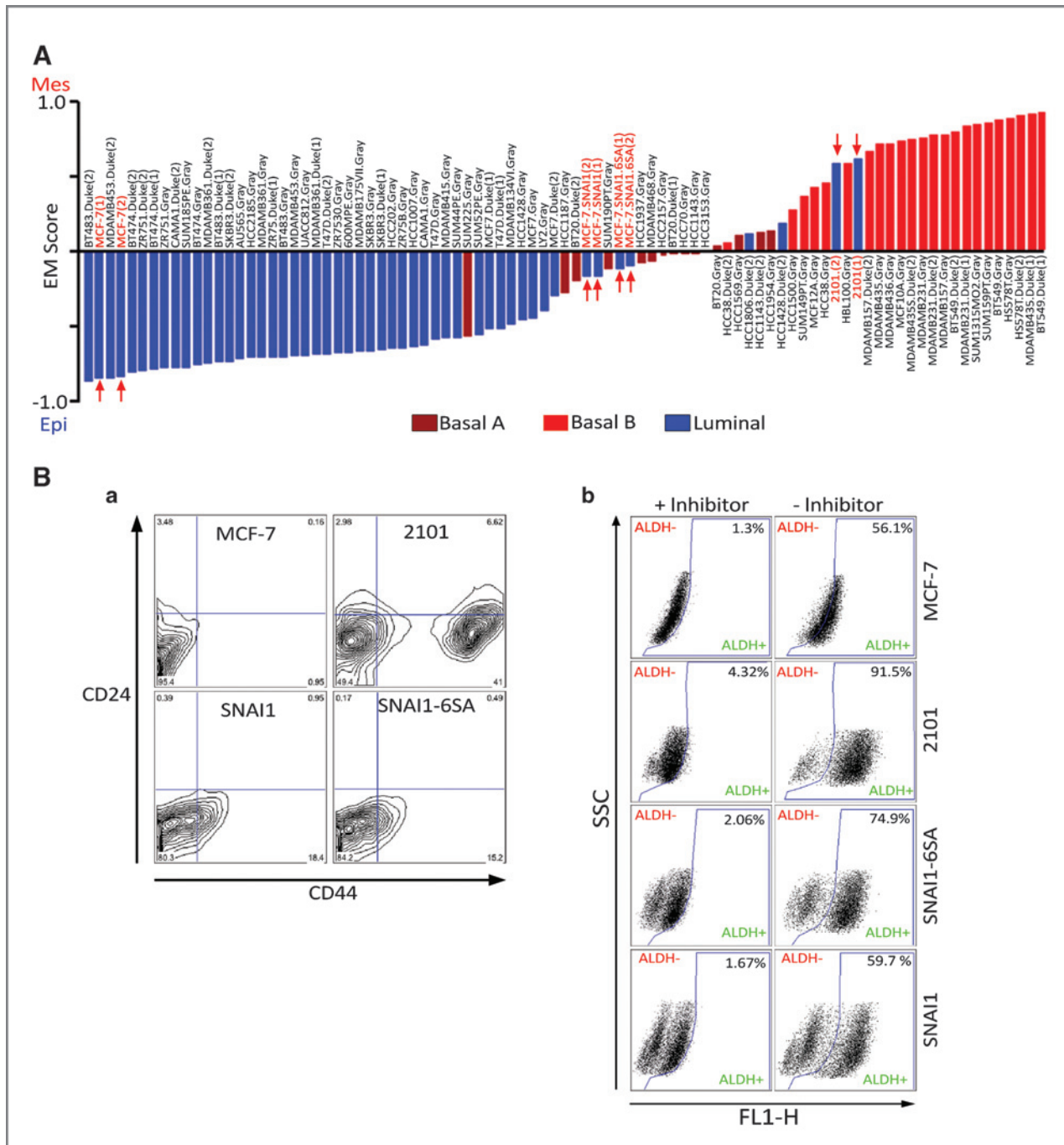
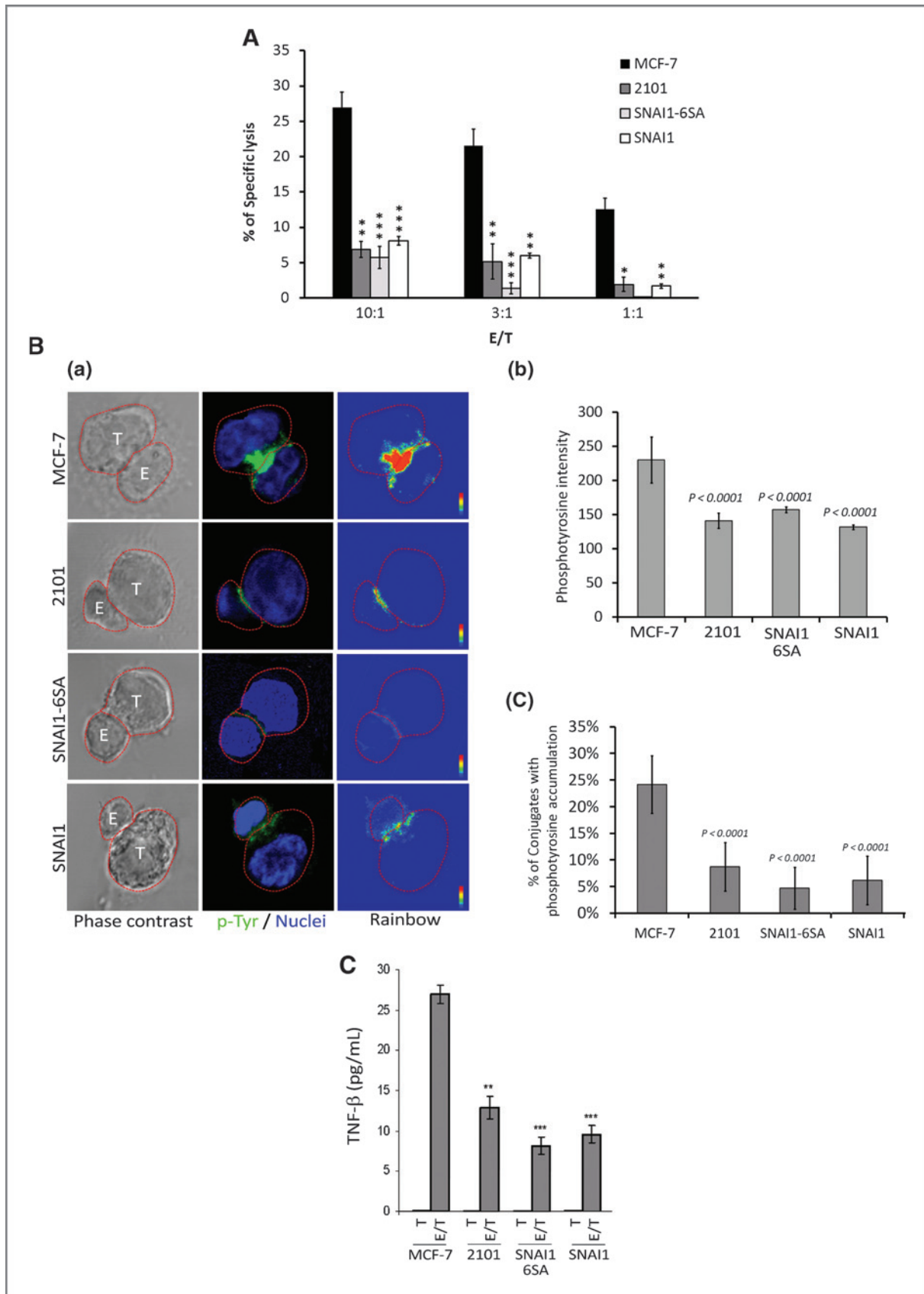


Figure 2. Differential EMT index is correlated with stem cell properties. A, EMT scores of cell lines. Underneath the bars is the corresponding breast cancer cell line name. B, impact of EMT-induced autophagy on cell surface markers of stemness and ALDH activity. a, contour plots are representative of CD44 and CD24 expression. b, identification of the ALDH^{low} and ALDH^{high} populations. The +DEAB (inhibitor) control samples were used to set the gate where all cells were excluded. This gate was then applied to the -DEAB test sample, identifying the ALDH^{high} population. The percentage of ALDH^{high} cells is indicated at the top right corner. The Aldefluor assay was repeated at least 2 times for each cell line using a different passage at each time.

2101, SNAI1, and SNAI1-6SA cells (Fig. 4A). To analyze the autophagy flux, mesenchymal cells were treated with chloroquine, which induces the accumulation of autophagosomes and prevents their degradation by lysosomes. Figure 4B shows that, in the absence of chloroquine, there was an increase in

both LC3-I and -II in the EMTed cells, suggesting autophagy induction in these cells. When mesenchymal cells were treated with chloroquine, there was an accumulation of LC3-II. Taken together, these data provide compelling evidence that autophagy flux is activated in cells undergoing EMT.

Akalay et al.



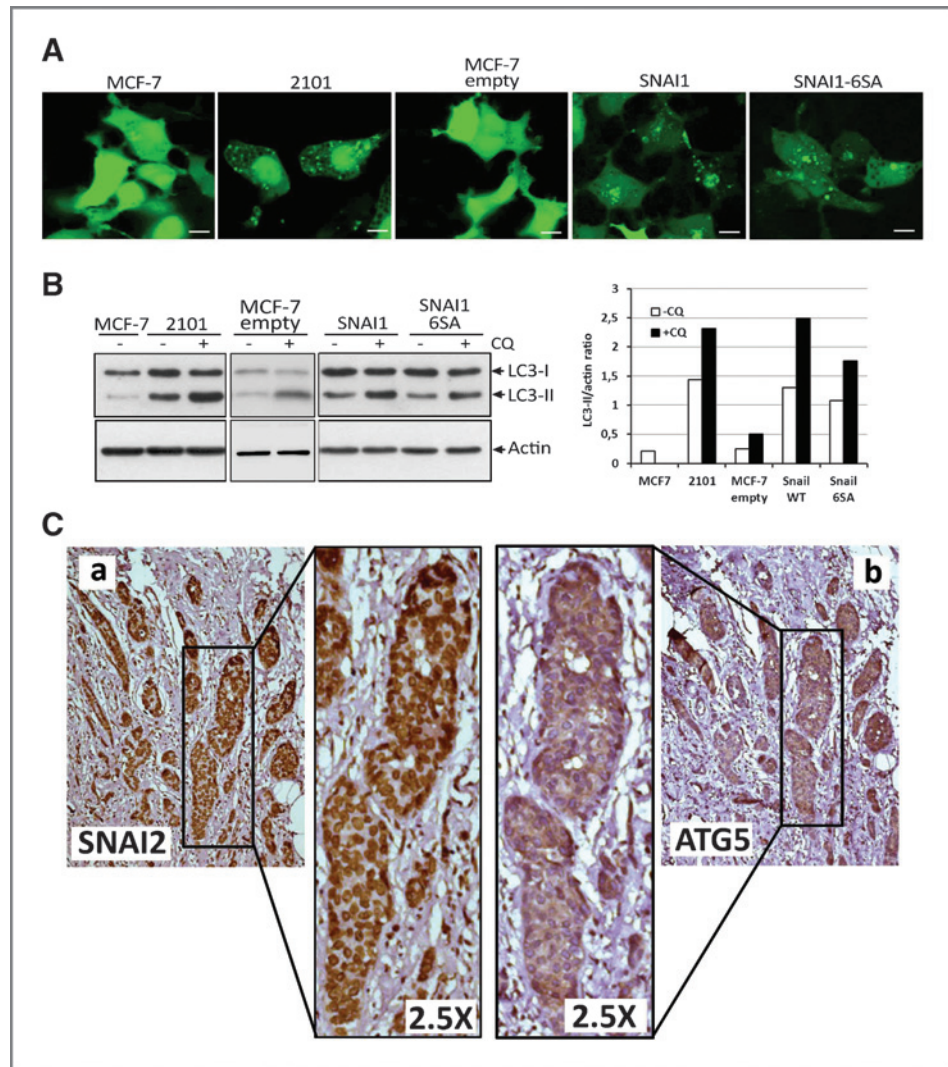


Figure 4. Autophagy flux in mesenchymal cell lines; coexpression of EMT and autophagy markers on human breast cancer serial tumor sections. A, formation of autophagosomes in GFP-LC3-expressing cells. Bar, 10 μ m. B, left, Western blot analysis of the expression of autophagy markers LC3-I and -II in cells cultured in the absence (-) or presence (+) of chloroquine (CQ). Right, quantification of LC3-II/actin ratio of the Western blotting results. C, a and b, human breast cancer biopsies were stained for SNAI2 and ATG5 expression by immunohistochemistry on serial tumor sections.

Interestingly, the expression of the autophagy marker ATG5 was detected in human breast cancer tissues expressing the EMT marker SNAI2 (Fig. 4C, a and b). This figure shows clearly that ATG5 is localized in SNAI2-positive areas of tumors. As shown in Supplementary Data S5, the result of co-expression of EMT and autophagy markers in human breast cancer tissues was confirmed using another autophagy marker (LC3B). These findings suggest that EMT and autophagy markers co-express in human breast cancer tissues.

Inhibition of autophagy by targeting *beclin1* (Fig. 5A, a) sensitized mesenchymal tumor cells to CTL-mediated killing (Fig. 5A, b), which suggests that the process of EMT activates autophagy-dependent mechanisms to maintain tumor cell

resistance to CTL. As EMTed ALDH⁺-sorted cells were more resistant to the CTL-induced cell lysis (Supplementary Data S2), we suggest that the induction of autophagy and stem-like properties by the EMT program is critically important for the emergence of tumor cell resistant variants.

Data mining analysis was conducted to provide insight on how EMT regulates autophagy. Gene array results showed that the majority of autophagy core machinery genes (ATG) were not regulated at the transcriptomic level in Snail-expressing cells. BECN1 (ATG6) is the only ATG gene that was found to be significantly upregulated in 2101, SNAI1, and SNAI1-6SA, by approximately 2-fold. This supports the notion previously reported that autophagy machinery is not regulated at the

Figure 3. EMT decreases target cell susceptibility and reactivity to CTL clone. A, cytotoxicity was determined by a conventional 4-hour ⁵¹Cr release assay at different ratios. Heu33 cells were used as effectors. Bars indicate SDs. B, (a), lack of phosphotyrosine accumulation at the immune synapse formed between T cells and mesenchymal cell lines (blue: nucleus; green: phosphotyrosine). quantification of phosphotyrosine intensity was conducted using the Region Measurements function of the ImageJ software (b). conjugates formed between T cells and tumor cells were scored by visual counting using a confocal microscope (c). Mean number of active synapses/field counted in 10 different fields/cell line were randomly selected. C, TNF- β production by the T-cell clone in response to tumor cell stimulation.

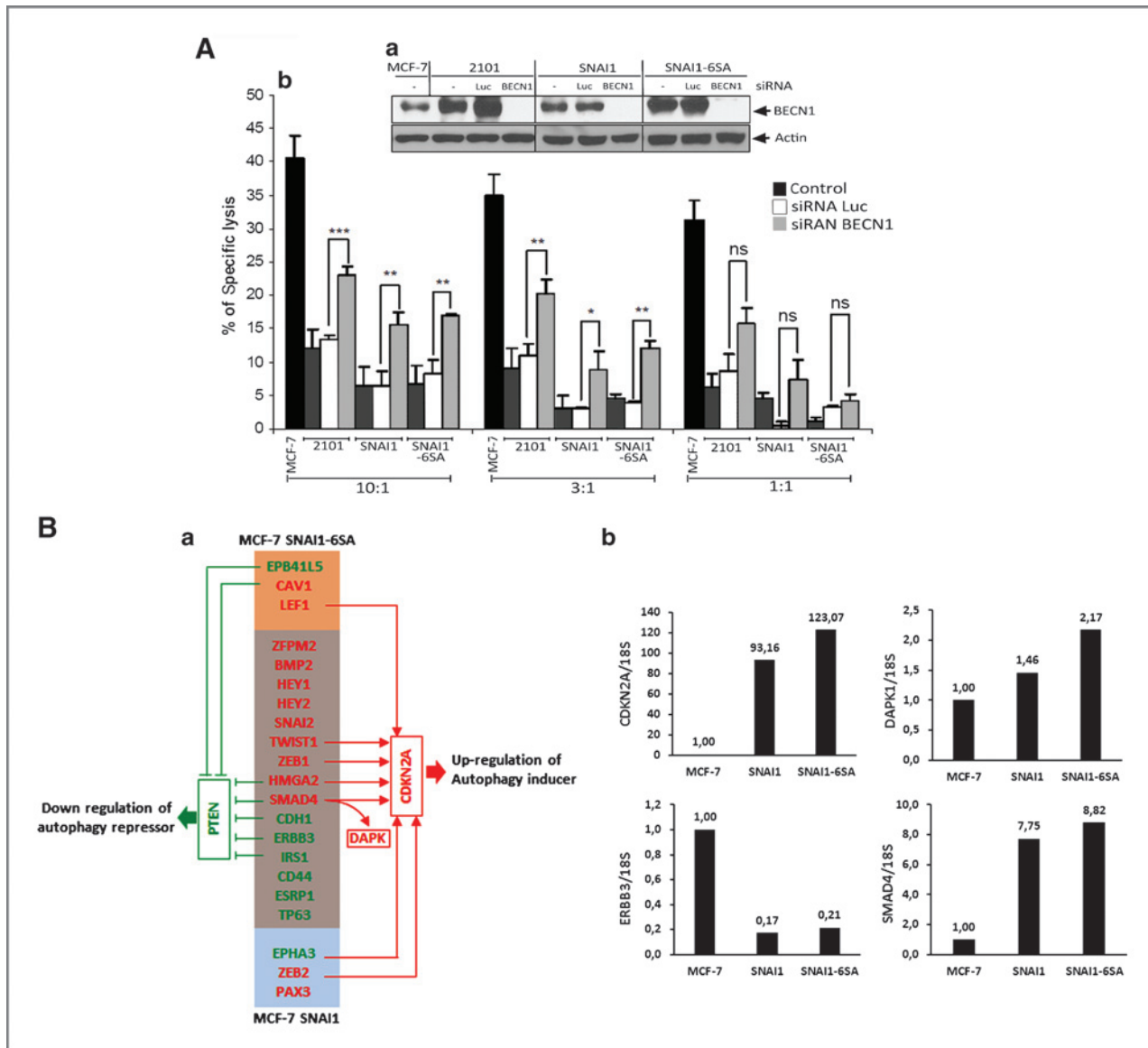


Figure 5. EMT-induced impairment of tumor cell susceptibility to CTL-mediated lysis is associated with the induction of autophagy. A, targeting EMT-induced autophagy restores mesenchymal tumor cells sensitivity to CTL-mediated lysis. Western blot analysis of the expression of beclin1 (BECN1) in untransfected cells and in cells transfected with either BECN1 or luciferase siRNAs (a). CTL-mediated cytotoxicity toward tumor cells at different E:T ratios (b). B, modulation of autophagy inducer and repressor genes in cells displaying an EMT phenotype. List of genes connecting EMT to autophagy (red, upregulated genes; green, downregulated genes; a). Real-time quantitative PCR (b) showing mRNA expression of selected genes involved in the induction/repression of autophagy. 18S was used as an endogenous control.

transcriptional level but mainly regulated by 3 types of post-translational modifications (phosphorylation, ubiquitylation, and acetylation; reviewed in ref. 24). As no transcriptional regulation of ATG genes involved in the core autophagy machinery was observed, we devoted more attention to the genes involved in the regulation of autophagy and thus identified DAPK1, PTEN, and CDKN2A. While the involvement of DAPK1 in the induction of autophagy is now well documented, PTEN and CDKN2A genes can regulate several cell functions, including cell cycle, apoptosis, and autophagy. Although much remains to be learned mechanistically, our result discloses for the first time a functional link between EMT and autophagy via

PTEN and CDKN2A and thus paves the way for further investigations.

In conclusion, these data indicate that the acquisition of an EMT phenotype is an additional immune escape mechanism in tumor cells. Of interest, cells undergoing EMT acquired resistance to CTL-induced cell death, which reveals an insight into the significance of tumor cell plasticity and tumor resistance pathways. More importantly, the present work shows a relationship between EMT, autophagy, stem-like characteristics, and resistance of cancer cells to CTL-induced killing. This is the first report, using expression profiling, to show the molecular link between EMT and autophagy in cells displaying an EMT

phenotype. The in-depth analysis of the precise contribution of EMT transcription factors in autophagy regulation and how this homeostatic process is mechanistically linked to the maintenance of breast stem cell marker expression in tumor cells may improve our understanding of the relationship between EMT and tumor resistance to immune surveillance. These results indicate that reversing EMT to avoid immune resistance may represent a promising treatment strategy. Unraveling autophagy, a pharmacologically targeted mechanism, as an EMT-induced process could help to sensitize resistant EMTed cells to immunotherapy approaches.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: I. Akalay, B. Janji, M. Hasmim, M.Z. Noman, S. Chouaib
Development of methodology: I. Akalay, M. Hasmim, S. Chouaib
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M. Hasmim, M.Z. Noman, F. Andre, P. Bertheau, C. Badoual, A.K. Larsen, N.T.Y. Hung, J.P. Thiery, S. Chouaib

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): I. Akalay, B. Janji, M. Hasmim, F. Andre, P. De Cremoux, T.Z. Tan, J.H. Keira, S. Chouaib

Writing, review, and/or revision of the manuscript: I. Akalay, B. Janji, M. Hasmim, M.Z. Noman, F. Andre, C. Badoual, P. Vielh, A.K. Larsen, M. Sabbah, J.P. Thiery, M. Mami-Chouaib, S. Chouaib

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): M. Mami-Chouaib, S. Chouaib

Study supervision: S. Chouaib

Acknowledgments

The authors thank Prof. Mien-Chie Hung at the MD Anderson Cancer Center for providing the MCF-7 (WT and SNAI1-6SA) cell lines.

Grant Support

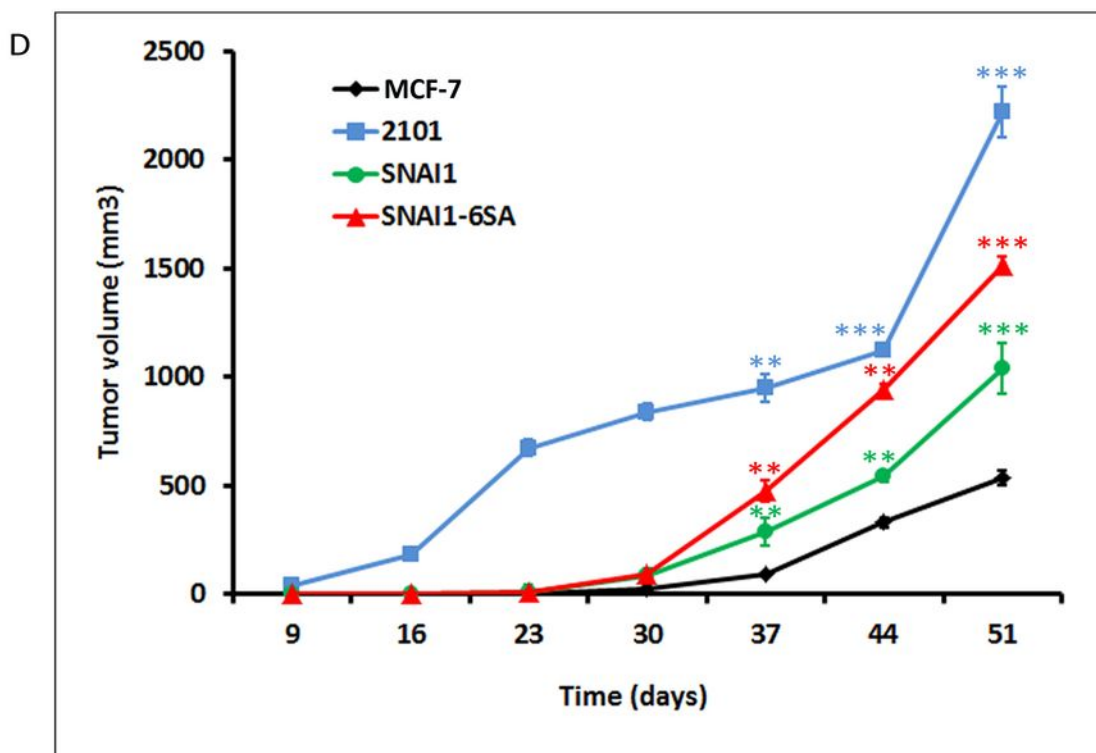
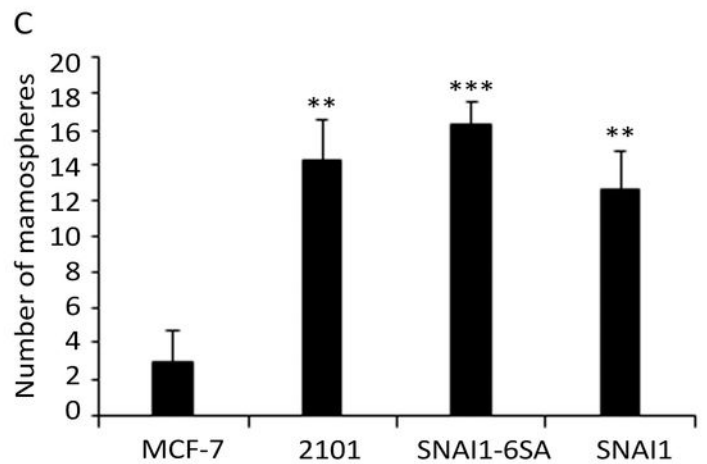
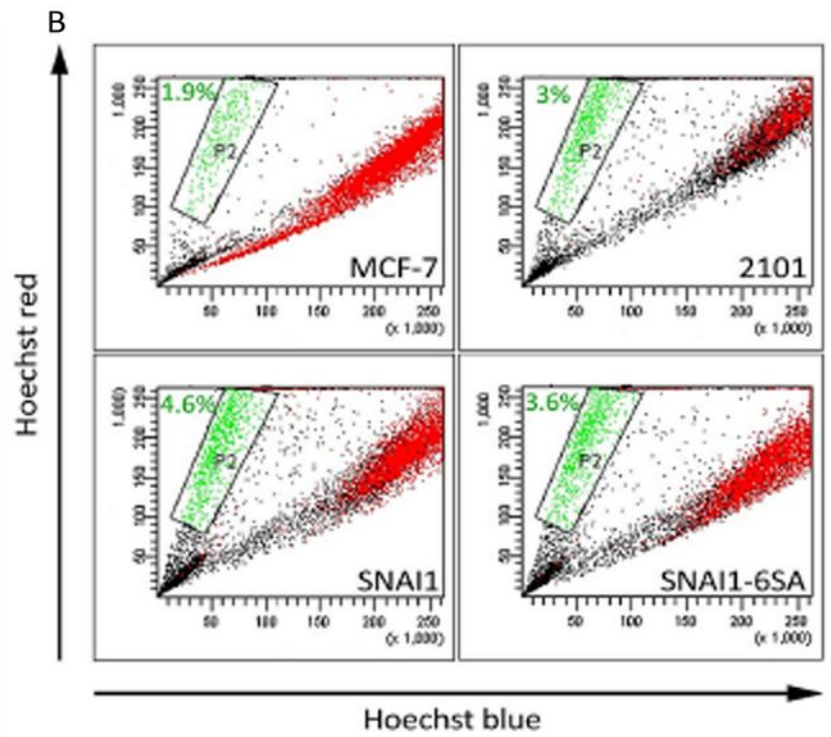
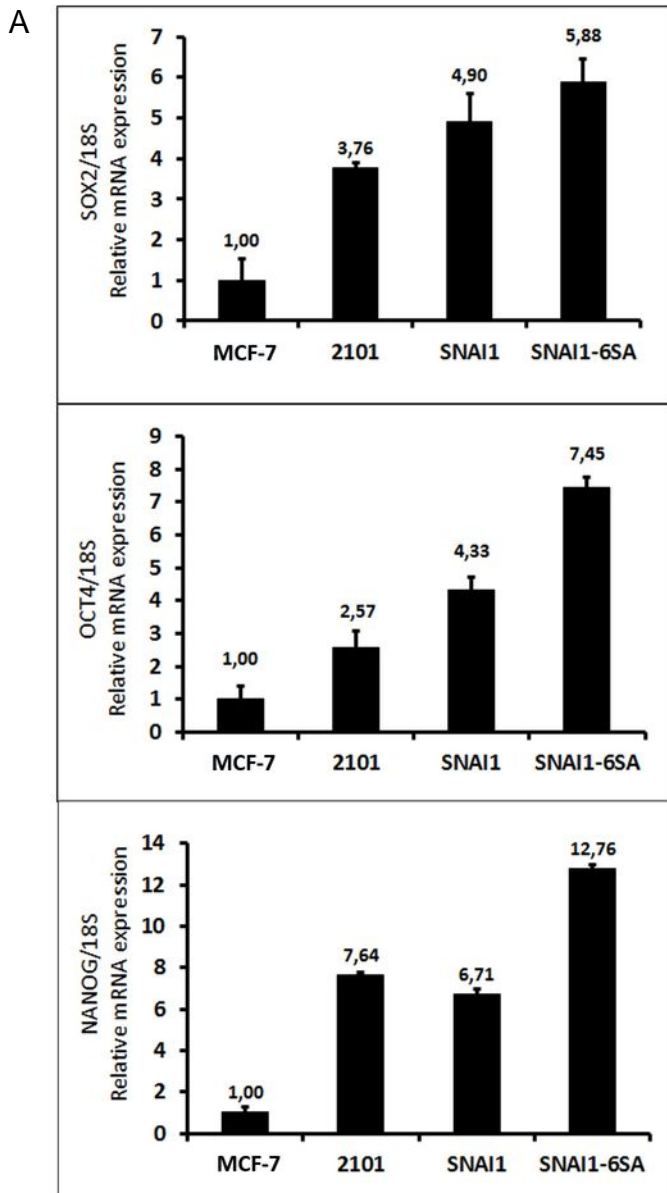
This work was supported by grants from INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer, Luxembourg Ministry of Culture, Higher Education and Research (Grant 2009 0201), A*STAR Institute of Molecular Cell Biology and Cancer Science Institute National University of Singapore core grants.

Received June 26, 2012; revised January 24, 2013; accepted January 25, 2013; published OnlineFirst February 22, 2013.

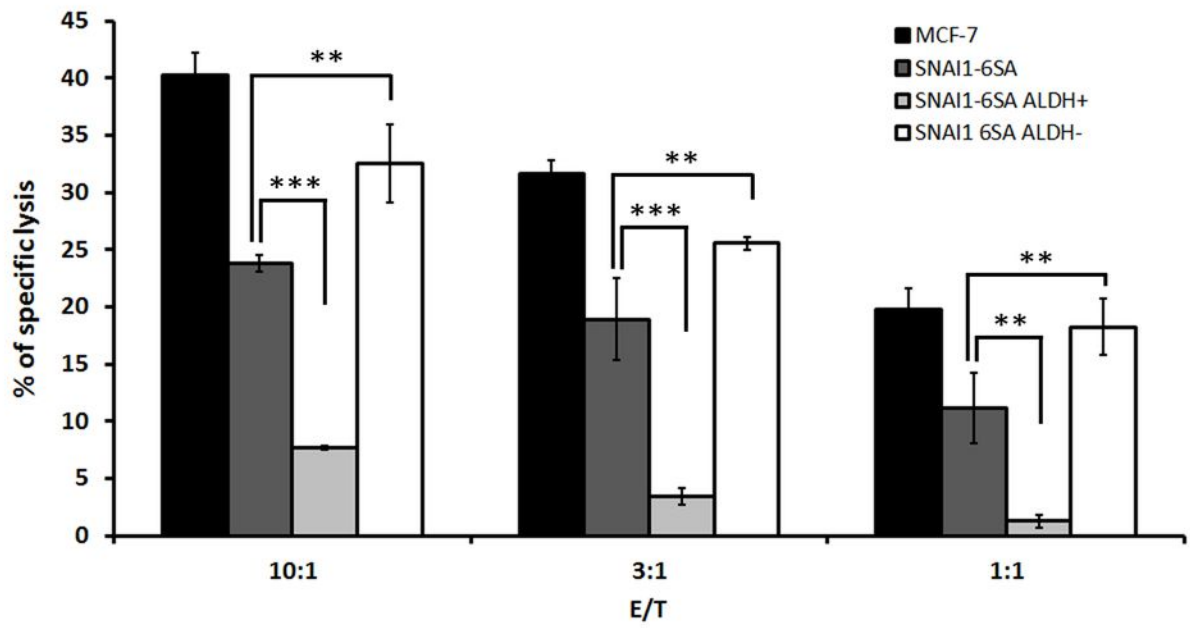
References

- Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med* 2001;250:462–75.
- Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997;18:493–7.
- Kiessling R, Wasserman K, Horiguchi S, Kono K, Sjoberg J, Pisa P, et al. Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:353–62.
- Anichini A, Molla A, Mortarini R, Tragni G, Bersani I, Di Nicola M, et al. An expanded peripheral T cell population to a cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined, melanocyte-specific antigen in metastatic melanoma patients impacts on generation of peptide-specific CTLs but does not overcome tumor escape from immune surveillance in metastatic lesions. *J Exp Med* 1999;190:651–67.
- Chouaib S. Integrating the quality of the cytotoxic response and tumor susceptibility into the design of protective vaccines in tumor immunotherapy. *J Clin Invest* 2003;111:595–7.
- Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 2009;15:195–206.
- Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 2008;68:3645–54.
- Abouzahr S, Bismuth G, Gaudin C, Caroll O, Van Ender P, Jalil A, et al. Identification of target actin content and polymerization status as a mechanism of tumor resistance after cytolytic T lymphocyte pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1428–33.
- Lavie G, Scarlatti F, Sala G, Levade T, Ghidoni R, Botti J, et al. Is autophagy the key mechanism by which the sphingolipid rheostat controls the cell fate decision? *Autophagy* 2007;3:45–7.
- Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008;14:818–29.
- Dorothee G, Echchakir H, Le Maux Chansac B, Vergnon I, El Hage F, Moretta A, et al. Functional and molecular characterization of a KIR3DL2/p140 expressing tumor-specific cytotoxic T lymphocyte clone infiltrating a human lung carcinoma. *Oncogene* 2003;22:7192–8.
- Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, et al. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 2000;275:8027–31.
- Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Amor-Gueret M, Feunteun J, Larsen AK, et al. Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene* 1997;15:2817–26.
- Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007;8:118–27.
- Gatza ML, Lucas JE, Barry WT, Kim JW, Wang Q, Crawford MD, et al. A pathway-based classification of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:6994–9.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17:98–110.
- El Hage F, Stroobant V, Vergnon I, Baurain JF, Echchakir H, Lazar V, et al. Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10119–24.
- Magnon C, Opolon P, Ricard M, Connault E, Ardouin P, Galaup A, et al. Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1alpha-mediated tumor apoptotic switch. *J Clin Invest* 2007;117:1844–55.
- HADb. Human Autophagy Database. www.autophagy.lu.
- Moussay E, Kaoma T, Baginska J, Muller A, Van Moer K, Nicot N, et al. The acquisition of resistance to TNFalpha in breast cancer cells is associated with constitutive activation of autophagy as revealed by a transcriptome analysis using a custom microarray. *Autophagy* 2010;7:760–70.
- Kim T, Veronese A, Pichiorri F, Lee TJ, Jeon YJ, Volinia S, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med* 2011;208:875–83.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–15.
- Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 2009;11:1487–95.
- McEwan DG, Dikic I. The Three Musketeers of autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends Cell Biol* 2011;21:195–201.

Akalay et al supplementary data 1



Akalay et al. supplementary data 2

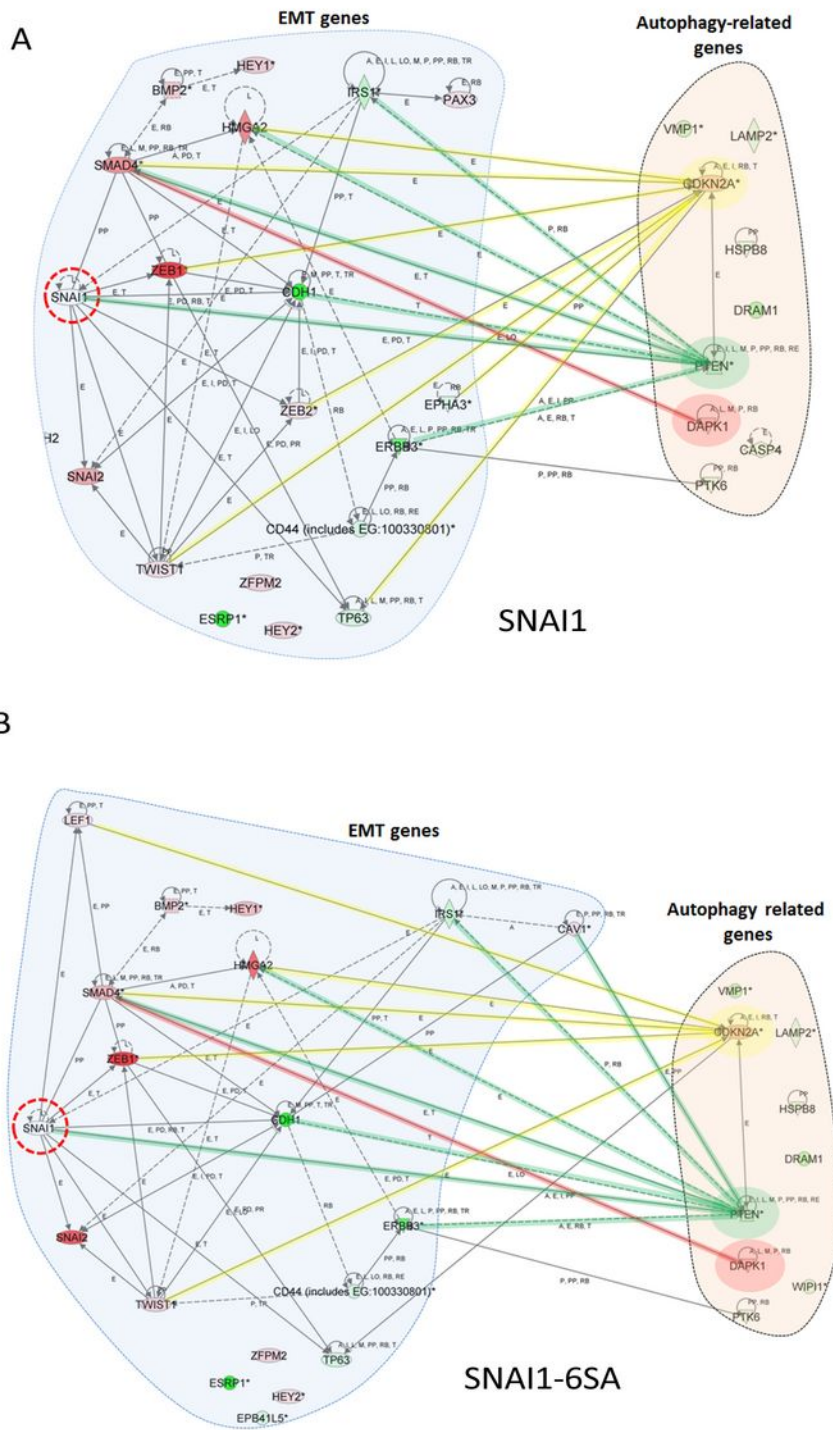


Akalay et al. supplementary data 3

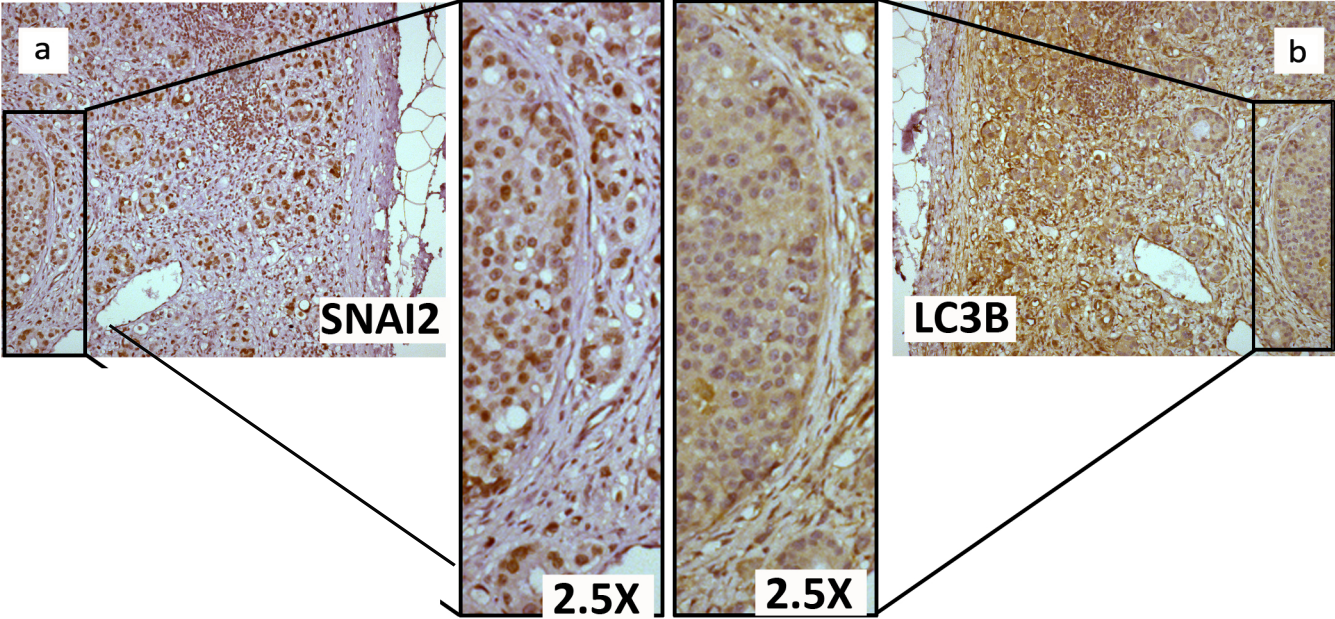
Symbol	Gene Name	p-value	Fold Change
EMT genes			
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	5.51E-08	115.35
HMGA2	high mobility group AT-hook 2	0.0000121	54.17
SMAD4	SMAD family member 4	0.00000521	49.17
SNAI2	snail homolog 2 (Drosophila)	0.000000814	37.91
BMP2	bone morphogenetic protein 2	8.05605E-05	22.58
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	1.6075E-06	21.74
ZFPM2	zinc finger protein, multitype 2	0.0000186	18.25
HEY2	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	0.0000138	18.15
PAX3	paired box 3	0.000395493	13.24
TWIST1	twist homolog 1 (Drosophila)	0.000000511	12.96
ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2	0.0000614	10.51
Autophagy-related genes			
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	8.00855E-05	22.76
DAPK1	death-associated protein kinase 1	0.000217682	16.24
DRAM1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	0.000000241	-48.12
VMP1	vacuole membrane protein 1	0.00000292	-30.97
PTK6	PTK6 protein tyrosine kinase 6	0.0000142	-13.87
PTEN	phosphatase and tensin homolog	0.00039729	-12.66
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	0.00000202	-12.06
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2	0.000013695	-11.06
HSPB8	heat shock 22kDa protein 8	0.00000508	-10.65

Symbol	Gene Name	p-value	Fold Change
EMT genes			
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	5.91E-08	106.33
SNAI2	snail homolog 2 (Drosophila)	0.000000381	81.03
HMGA2	high mobility group AT-hook 2	0.00000931	71.13
SMAD4	SMAD family member 4	0.00000755	34.76
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	1.0435E-06	30.61
BMP2	bone morphogenetic protein 2	7.50235E-05	24.09
TWIST1	twist homolog 1 (Drosophila)	0.000000272	20.04
ZFPM2	zinc finger protein, multitype 2	0.0000169	19.58
CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	0.0000153	10.93
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	0.0000676	10.90
HEY2	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	0.0000343	10.03
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.00000189	-191.65
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	0.000136945	-11.64
EPB41L5	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5	0.0000178	-11.51
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	0.00000542	-83.81
ESRP1	epithelial splicing regulatory protein 1	0.00000129	-149.42
IRS1	insulin receptor substrate 1	0.0000485	-23.62
TP63	tumor protein p63	0.000000863	-14.62
Autophagy-related genes			
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	5.495E-05	31.21
DAPK1	death-associated protein kinase 1	0.000144248	22.10
DRAM1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	0.000000278	-41.91
VMP1	vacuole membrane protein 1	0.00000249	-35.73
WIPI1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	0.0000449	-16.55
PTK6	PTK6 protein tyrosine kinase 6	0.0000131	-14.61
PTEN	phosphatase and tensin homolog	0.000695346	-14.33
HSPB8	heat shock 22kDa protein 8	0.00000358	-13.22
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2	1.0835E-05	-12.69

Akalay et al. supplementary data 04



Akalay et al supplementary data 5



SUPPLEMENTARY DATA LEGENDS:**Figure S1. Cancer stem cell properties of EMTed and autophagic cell lines.**

(A) Relative expression of *SOX2*, *OCT4* and *NANOG* mRNAs was monitored by SYBR-Green qRT-PCR in MCF-7 and EMTed cell lines. Expression level of 18S was used as an endogenous control. **(B)** Detection of side population (SP) enriched in stem cells by flow cytometry. Hoechst 33342 (HO)-stained MCF-7 and EMTed cells were separated into SP cells that efflux the dye (fluorescence negative) and non-SP cells that retain the dye (fluorescence positive). **(C)** MCF-7- and EMTed cell line-derived mammospheres. Mammospheres were generated by seeding a single tumor cell per well previously coated with the non-adhesive substrate 2-hydroxyethylmethacrylate (poly-HEMA [Sigma]). Three 96-well plates were used to quantify mammospheres for each cell line. **(D)** *In-vivo* tumorigenic capacity: MCF-7 and EMTed cell lines (10×10^6 cells/mouse) were subcutaneously inoculated into the right flank of Balb-Ragyc^{-/-} female mice (5 weeks of age, n = 4 per group). Before cell injections, pellets releasing 17 β -estradiol were implanted between the skin and muscle after skin incision. Error bars represent mean \pm S.D. * p < 0.001.

Figure S2. SNAI1-6SA cells were sorted by flow cytometry (MoFlo[®] Astrios[™] - Beckman Coulter, Inc) based on their ALDH activity. Sorted SNAI1-6SA-ALDH⁺ and SNAI1-6SA-ALDH⁻ cells were then submitted to a conventional 4h ⁵¹Cr release assay with Heu33 CTL clone. Bars indicate SDs.

* p < 0.001.

Figure S3. List of EMT- and autophagy-related differentially expressed genes in SNAI1- and SNAI1-6SA-expressing MCF-7 cells.

Figure S4. Data mining of microarray data showing the connections between EMT and autophagy-related genes.

Figure S5. Human breast cancer biopsies were stained for SNAI2 and LC3B expression by immunohistochemistry on serial tumor sections.

EMT impairs breast carcinoma cell susceptibility to CTL-mediated lysis through autophagy induction

Intissar Akalay,¹ Bassam Janji,^{2,†} Meriem Hasmim,¹ Muhammad Zaeem Noman,¹ Jean Paul Thiery,^{3,4,5} Fathia Mami-Chouaib¹ and Salem Chouaib^{1,*}

¹Unité INSERM U753; Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France; ²Laboratory of Experimental Hemato-Oncology; Department of Oncology; Public Research Center for Health (CRP-Santé); Luxembourg City, Luxembourg; ³Cancer Science Institute of Singapore; National University of Singapore; Singapore; ⁴Institute of Molecular and Cell Biology; A*STAR (Agency for Science, Technology and Research); Singapore; ⁵Biochemistry Department; National University of Singapore; Singapore

[†]These authors contributed equally to this work.

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) has become one of the most exciting fields in cancer biology. While its role in cancer cell invasion, metastasis and drug resistance is well established, the molecular basis of EMT-induced immune escape remains unknown. We recently reported that EMT coordinately regulates target cell recognition and sensitivity to specific lysis. In addition to the well-characterized role for EMT in tumor phenotypic change including a tumor-initiating cell phenotype, we provided evidence indicating that EMT-induced tumor cell resistance to cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) also correlates with autophagy induction. Silencing of BECN1 in target cells that have gone through the EMT restored CTL susceptibility to CTL-induced lysis. Although EMT may represent a critical target for the development of novel immunotherapy approaches, a more detailed understanding of the inter-relationship between EMT and autophagy and their reciprocal regulation will be a key determinant in the rational approach to future tumor immunotherapy design.

It is well established that the growth and spread of cancer depends as much on the host response to tumor as on the biological characteristics of the tumor itself. This interaction is at its most intimate and dynamic within the tumor microenvironment. In this regard, evidence has

been accumulated clearly indicating that antitumor CTL induction is not sufficient because effector T cells are downregulated in situ. This is in part due to the plasticity and complexity of the tumor microenvironment. In this respect, there are increasing indications that the tumor stroma components play a crucial role in the control of the local immune response, and contain many overlapping mechanisms to maintain tumor functional disorder and evasion of antigen-specific CTLs.

In a recent report, using the breast MCF-7-derived tumor cells that have undergone EMT following overexpression of wild-type SNAIL1/SNAIL or the constitutively activated (SNAIL1-6SA) protein, or by the acquisition of TNF α resistance (2101 cells), we showed that EMT transcription factors are not the only way to induce an enhanced phenotypic plasticity resulting in breast cancer cell resistance to CTLs. We also show that the acquisition of resistance to TNF leads to EMT induction and the subsequent resistance to antigen-specific killer cells. It is worth noting that the acquisition of resistance to TNF and the high EMT score of TNF-resistant (2101) cells suggest the existence of a level of complexity in the EMT process in which multiple molecules act together to mediate EMT, rather than the master regulators acting on their own.

Consistent with the role of autophagy as a cell-protective mechanism, we investigated whether the activation of the EMT

Keywords: epithelial mesenchymal transition, autophagy, cytotoxic T-lymphocytes, breast cancer

Submitted: 04/07/13

Revised: 04/16/13

Accepted: 04/17/13

<http://dx.doi.org/10.4161/auto.24728>

*Correspondence to: Salem Chouaib;
Email: chouaib@igr.fr

Punctum to: Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, André F, De Cremoux P, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T cell-mediated lysis. *Cancer Res* 2013; 73:2418–27; PMID:23436798; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2432>

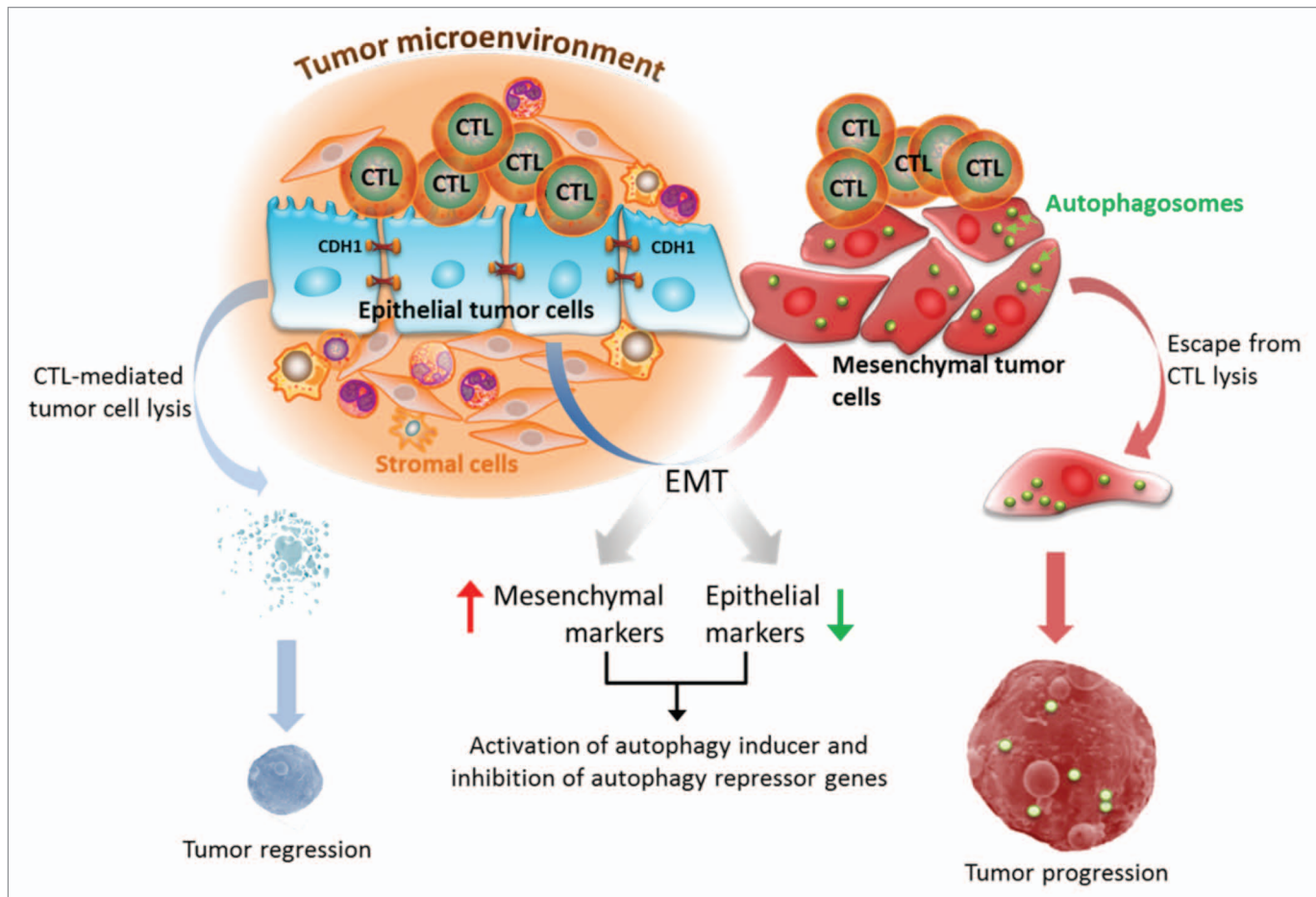


Figure 1. The acquisition of an EMT phenotype in the context of microenvironmental stroma reactivity confers resistance to CTL-mediated lysis through autophagy induction.

program in tumor cells is associated with the induction of autophagy. Our results showed that expression of *SNAI1* in breast cancer cells induces an epithelial dedifferentiation program that coincides with a drastic change in cell morphology and the activation of autophagy flux. Interestingly, we found that *BECN1* is upregulated in mesenchymal cells compared with epithelial cells. Although the molecular mechanism by which the EMT program affects the expression of *BECN1* remained to be addressed, several lines of evidence indicate that this may be related to *SNAI1*- or EMT-dependent repression of a miRNA(s) involved in modulation of *BECN1* expression. Indeed, it has been reported that *MIR30A* inhibits the expression of *BECN1*, and that the transcription factors *SNAI1* and *ZEB1* bound to E-boxes in the *MIR34A/B/C* promoters, thereby repressing *MIR34A* and *MIR34B/C* expression. While much

remains to be learned mechanistically, this result extended the role of *SNAI1* as a regulator of autophagy and paves the way to an interesting topic of research. Although targeting *BECN1* in mesenchymal cells is sufficient to restore CTL-mediated tumor cell lysis, it has no effect on cell morphology and the expression of EMT markers. This finding suggests that autophagy is a downstream target of the EMT program in breast cancer cells. It is worth noting that our results are not in line with other recently published reports showing that autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of the EMT.

To identify transcriptional changes of other autophagy core machinery genes that are specific responses toward *SNAI1* expression, a comparative differential gene expression analysis using cDNA microarrays was performed. We did not detect any modulation of *ATG* genes in

SNAI1-overexpressing breast cancer cells, suggesting that *SNAI1* or the EMT program induces autophagy independently of the modulation in the expression of *ATG* genes. Data mining of microarray results predicted, however, a functional link between an EMT marker and some autophagy inducers and repressors. These data strongly suggest that the EMT activates autophagy flux indirectly by regulating key autophagy repressor or inducer genes. In order to further understand the relationship between the EMT and tumor resistance to immune surveillance, ongoing studies are focusing on the analysis of the precise contribution of EMT transcription factors in autophagy regulation and how this homeostatic process is mechanistically linked to the maintenance of breast stem cell marker expression in tumor cells.

Our studies suggest EMT-induced autophagy is a novel mechanism by which tumor cells regulate CTL reactivity and

impede their cytotoxic activity and further point to the complex relationship between the tumor system and the immune system. They also suggest that the selection of cells that have gone through the EMT, through autophagy-induced resistance, among epithelial tumor cells may originate not only from signals produced by the nontumor cells that constitute the tumor microenvironment, but also by the immune effectors infiltrating the tumors and their secreted cytokines (i.e., TNF, TGF β 1). This also suggests that the antigen-specific killer cells not only have antitumor function, but also paradoxically immunoedits tumors, facilitating tumor escape and progression. Although much remains to be explored in the EMT-MET (mesenchymal epithelial transition) cycle in controlling metastasis, the systematic determination of EMT score may improve the therapeutic management of

breast carcinomas, and strategies to target cells that have gone through the EMT might hold promise for prevention or treatment.

Tumor stroma components are engaged in an active molecular crosstalk that has serious implications for immunological recognition of tumor in shaping the microenvironment. Accordingly, the various strategies aimed at the induction of antitumor cytotoxic responses should therefore consider the morphological changes described in this report as an antitumor mechanism of tumor escape, partly involved in resistance of tumor cells to cytotoxicity. Therefore, a better understanding of the crosstalk between cytotoxic T cells and tumor stroma-induced EMT as well as the molecular mechanisms that regulate EMT-induced resistance to cell death of cells that are committed to progress and invade, may open new perspectives for the

development of novel treatment strategies to enhance the efficacy of cancer immunotherapy. Our results clearly suggest new insights into immunotherapeutic strategies by manipulating EMT and autophagy to avoid tumor immune evasion. However, preclinical work will be needed to test more specific autophagy inhibitors and block autophagy in tumors, as well as allow EMT targeting (Fig. 1).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was supported by funding from the French league against cancer, the “Association de Recherche sur le Cancer” (ARC) to S.C., and grant FC/2012/02 from “Fondation Cancer,” Luxembourg to B.J.

Partie II : Akalay I *et al.*, Manuscript submitted for publication



Targeting WNT1-inducible signaling pathway protein 2 (WISP2) alters human breast cancer cell susceptibility to specific lysis through regulation of KLF-4 and miR-7 expression

Intissar Akalay¹, Tuan Zea Tan², Prashant Kumar², Bassam Janji³, Fathia Mami-Chouaib¹, Cécile Charpy⁴, Philippe Vielh⁴, Annette K.Larsen⁵, Jean Paul Thiery^{2, 6, 7}, Michèle Sabbah⁵, Salem Chouaib¹

Author's affiliations:

¹ INSERM U753, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 114, rue Edouard Vaillant, Villejuif 94805, France;

² Institute of Molecular and Cell Biology, A*STAR, (Agency for Science, Technology and Research), Singapore;

³ Laboratory of Experimental Hemato-Oncology, Department of Oncology, Public Research Center for Health (CRP-Sante), Luxembourg City, Luxembourg;

⁴ Laboratoire de Recherche Translationnelle-module d'histocytopathologie et Centre de Ressources Biologiques, Institut de cancérologie Gustave-Roussy, 114, rue Edouard Vaillant, Villejuif 94805, France;

⁵ Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM U938 and Université Pierre et Marie Curie, Paris 75012, France;

⁶ Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore;

⁷ Biochemistry Department, National University of Singapore, Singapore.

Corresponding Author: Salem Chouaib, INSERM U753, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex, France. Phone: 33142114547; Fax: 33142115288; e-mail: Salem.CHOUAIB@gustaveroussy.fr

Running title: WISP2 regulates CTL-mediated lysis

ABSTRACT

The molecular basis for the resistance of tumor cells to cell-mediated cytotoxicity remains poorly understood and thus poses a major challenge for cancer immunotherapy. The present study was designed to determine whether the WNT1-inducible signaling pathway protein-2 (WISP2, also referred to as CCN5), a key regulator of tumor cell plasticity, interferes with tumor susceptibility to Cytotoxic T Lymphocytes (CTL)-mediated lysis. We found that targeting WISP2 signaling in human breast adenocarcinoma MCF7 cells impairs CTL-mediated cell killing by a mechanism involving Kruppel-like factor-4 (KLF-4) induction and microRNA-7 (miR-7) downregulation. Inhibition of TGF- β signaling using the A83-01 inhibitor in MCF7-shWISP2 cells resulted in a significant reversal of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) phenotype, the expression of stem cell marker KLF-4 and a partial recovery of target susceptibility to CTLs. More importantly, we showed that silencing of KLF-4 was accompanied by a reduction in MCF7-shWISP2 resistance to CTLs. Using human breast cancer tissues, we demonstrated the coexpression of KLF-4 with EMT markers and TGF- β pathway. More importantly, we found that KLF-4 expression was accompanied by miR-7 inhibition, which is partly responsible for impairing CTL-mediated lysis. Thus, our data indicate that WISP2 plays a role in regulating tumor cell susceptibility through EMT by inducing the TGF- β signaling pathway, KLF-4 expression and miR-7 inhibition. These studies indicate for the first time that WISP2 acts as an activator of CTL-induced killing and suggests that the loss of its function promotes evasion of immunosurveillance and the ensuing progression of the tumor.

Keywords: WISP2, TGF- β , EMT, CTL, KLF-4, miR-7

INTRODUCTION

Although the identification of tumor-associated antigens (TAAs) provided a new arsenal of approaches to enhance antigen-specific immune responses, the immunotherapy approaches that are currently used in the clinic have only had limited success. The ultimate goal of most of the reported immunotherapy strategies is to induce a strong cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. The prevailing view is that induced CTLs will eradicate tumor cells. However, this view has been seriously challenged by clinical observations showing that, even if a strong and sustained cytotoxic response is induced, complex issues persist, such as tumor evasion, and the selection of immune-resistant tumor cell variants remain¹. The coexistence of tumor cells and tumor-specific circulating CD8⁺ T cells in cancer patients remains an intriguing paradox in tumor immunology. Extensive studies have shown that tumor cells themselves play a crucial role in modulating the host immune response, so that they can maintain their functional disorder and evade immune surveillance.² In this regard, it has been suggested that tumor cell growth *in vivo* is not only influenced by CTL-tumor cell recognition, but also by tumor susceptibility to cell-mediated death.³ Although the resistance of tumor cells to cell-mediated cytotoxicity remains a major impediment for cancer immunotherapy, its molecular basis is poorly understood. Resistance to CTL-mediated cytotoxicity has been attributed to several possible mechanisms,⁴ and growing evidence suggests a gain of plasticity is a new tumor adaptation to escape immunological strategies during tumor progression.⁵ In this regard, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a de-differentiation process implicated in metastasis and the generation of cancer initiating cells (CICs) in solid tumors, has been reported to involve the activation of several important pathways that help tumors survive, grow and evolve into highly invasive and metastatic variants.⁶

WISP2/CCN5 is constitutively expressed in less-aggressive human breast cancer cell lines, but minimally detected in moderately aggressive breast cancer cell lines and undetectable in highly aggressive lines.^{7,8} It has been suggested that WISP2 plays a role in the maintenance of a

differentiated and non-invasive phenotype in human breast cancer cells,⁸ and reports indicate that a loss in WISP2 activity may promote breast cancer progression.^{9,10,11} However, WISP2 has both growth-promoting and growth-arresting competence, depending on the cell type and the cellular microenvironment.¹² There is significant experimental evidence to show that WISP2 plays an anti-invasive role in carcinogenesis through controlling adhesion and cell motility^{9,8} and interfering with EMT. In previous studies, we showed that EMT coordinately regulates target cell recognition and sensitivity to specific lysis by promoting autophagy,^{13,14} suggesting that EMT may represent a critical target for the development of novel immunotherapeutic approaches. Although the role of WISP2 in oncogenesis has been well characterized, its putative role in the regulation of the immune system remains unknown.

In consideration of these previous findings, we sought to determine whether WISP2 exerts its tumor growth control function by interfering with the anti-tumor cytotoxic response. Our data indicate that WISP2 may orchestrate a dynamic molecular cross-talk between killer cells and target cells that has implications for recognition of the tumor by immune cells and in shaping tumor target sensitivity to CTL-induced cell death.

RESULTS

Targeting WISP2 activates TGF- β signaling and induces EMT, as respectively revealed by ssSGEA and EMT score

WISP2 functions to suppress TGF- β -induced transcriptional responses as well as invasion that occurs concomitant with EMT.¹⁰ Immunofluorescence analysis showed down-regulation of the epithelial markers E-cadherin, β -catenin, ZO-1 and cytokeratin 18 in the MCF7-shWISP2 cell line compared with parental MCF7 cells and shScrambled cells (Figure 1A). To evaluate the influence of WISP2 targeting on the degree of TGF- β -signaling activation, we performed ssGSEA¹⁵ using four gene sets related to TGF- β signaling (Figure 1B) from Msigdb v3.0.¹⁶ We found that TGF- β signaling was increased significantly in WISP2-knockdown cells as compared with the parental MCF7 or MCF7-shScrambled (Mann-Whitney U-test, $p = 0.004$). We next used the EMT score to quantitatively estimate the effect of WISP2 targeting on the degree of ‘EMT-ness’ in the cells,¹³ with most epithelial-like cells bearing an EMT score of -1.0, and most mesenchymal-like exhibiting a score of +1.0. A large shift in the EMT score from -0.97~-1.0 to +0.34 was observed when MCF7 were treated with shWISP2 (Figure 1C). This finding demonstrates that WISP2 knockdown MCF7 cells acquired a mesenchymal-like phenotype in contrast to the epithelial-like parental or shScrambled-treated MCF7 cells. This is in concordance with a gain in the expression of EMT markers SNAI1 (Snail), SNAI2 (Slug), Twist, Zeb1, Vimentin and N-cadherin for MCF7 with shWISP2 (Supplementary data 1; Sabbah et al., submitted for publication).

Down-regulation of HLA-A2 and TAP1/2 expression, and altered CTL reactivity by targeting WISP2

To examine the functional consequences of WISP2-induced TGF- β signaling in MCF7 cells, we tested their susceptibility to lysis by the H33 CTL clone, which can lyse the parental MCF7 cell line in a HLA-A2-restricted manner.¹⁷ As shown in Figure 2A, we observed a significant decrease in shWISP2 cell lysis as compared with parental MCF7 or shScrambled cells. Based on these data, we

attempted to determine whether the decrease in target killing interferes with CTL reactivity. For this purpose, we first tested the influence of WISP2 loss on HLA-A2 expression. FACS analysis indicated a significant decrease in HLA-A2 expression in WISP2-knockdown cells (Figure 2B(a)). Furthermore, western blotting analysis showed that both TAP1 and TAP2 expression were down-regulated in MCF7-shWISP2 cells as compared with the control cells (Figure 2B(b)). More importantly, co-culture of the H33 CTL clone with MCF7-shWISP2 resulted in a significant inhibition of TNF- β secretion by this clone (Figure 2B(c)). Collectively, these data indicate that WISP2 targeting interferes with the cross-talk between CTLs and their target and induces an alteration in CTL reactivity.

Selective induction of KLF4 following WISP2 targeting and its silencing alleviates MCF7-shWISP2 resistance to CTLs

Previous studies have indicated that the expression of the stemness transcription factor Nanog regulates cell susceptibility to CTL-mediated cell killing.¹⁸ We therefore examined the effect of WISP2 targeting on the acquisition of stem cell-like properties, such as the expression of stem cell transcription factors SOX2, OCT4, Nanog, CD133, and KLF4. Results from qRT-PCR showed a lack of increase in the expression of these transcription factors in shWISP2-mesenchymal cell line with the exception of KLF4, which was strongly overexpressed in these cells as compared with the parental MCF7 and shScrambled cells (Figure 3A). These results suggest that activation of TGF- β signaling in EMTed MCF7-shWISP2 cells confers stem cell-like properties to these cells through the positive regulation of KLF4 expression.

To determine the putative role of this transcription factor in the regulation of MCF7-shWISP2 cell susceptibility to CTL-mediated lysis, we explored the functional consequences of KLF4 silencing using specific siRNA. MCF7-shWISP2 cells were silenced for KLF4 and subsequently used as targets in a cytotoxic assay. As shown in Figure 3B, silencing of KLF4 significantly restored the

susceptibility of MCF7-shWISP2 cells to CTL clone-mediated lysis. These results indicate that KLF4 plays an important role in the regulation of mesenchymal cell susceptibility to CTL-mediated lysis.

KLF4 coexpresses with EMT markers and TGF- β signaling pathway proteins

We identified *in vitro* that WISP2 targeting induced activation of the TGF- β /Smad signaling pathway to regulate KLF4 expression. Thus, we next asked whether EMT markers, TGF- β pathway proteins and KLF4 were co-expressed in human tissue breast carcinoma of the basal-like subtype using immunohistochemistry. For this purpose, twenty patient biopsies were used. We found that the expression of EMT and TGF- β signaling markers correlated with KLF4 expression in these samples (Figure 4). As depicted in Figure 4, Twist, TGF- β , and SMAD2/3 proteins and a loss of E-cadherin expression are localized in KLF4-positive areas of tumors. These findings illustrate that EMT/TGF- β signaling markers are co-expressed with KLF4 in human invasive basal breast carcinoma.

TGF- β -mediated inhibition of target cell susceptibility to specific lysis through regulation of miR-7 expression

To gain more insight into how TGF- β signaling regulates the expression of KLF4, we performed miRNA profiling in untreated and A83-01-treated MCF7-shWISP2 cells and assessed the expression of 59 miRNAs (Figure 5A). We first compared the profile of miRNA in shScrambled and shWISP2-expressing cells. Such profiling yielded a list of 26 (44%) up- and 29 (49%) down-regulated miRNAs in MCF7-shWISP2 cells, thus displaying an activated TGF- β signaling. The expression of only four miRNAs (6.7%) was not affected in MCF7-shWISP2 cells. Similar profiling was next performed in untreated and A83-01-treated MCF7-shWISP2 cells displaying inhibited TGF- β signaling. Interestingly, we showed that the number of up- and down-regulated miRNAs dramatically dropped to only two up- and two down-regulated miRNAs (Figure 5B). This data indicates that the activation of TGF- β signaling in MCF7-shWISP2 cells regulates some miRNAs involved in the regulation of several signaling pathways. Having demonstrated that KLF4 plays a critical role in MCF7-shWISP2 cells, we focused our attention on miRNAs that target this gene. *In silico* analysis using the miRDB

database revealed that KLF4 is predicted to be targeted by 47 miRNAs. Among these 47 miRNAs, we identified four candidates (miR-7-5p, miR-429, miR-200b-3p and miR-200c-3p) whose expression was inversely correlated with that of KLF4 in shWISP2-expressing cells (Figure 5C). The regulated expression of these miRNAs was validated by real-time PCR in MCF7-shScrambled, MCF7-shWISP2 and A83-01-treated MCF7-shWISP2 cells (Figure 5D). This result further indicates that the impairment of CTL-mediated lysis in MCF7-shWISP2 cells is most likely related to the TGF- β -dependent inhibition of miR-7-5p, miR-429, miR-200b-3p and miR-200c-3p expression involved in targeting KLF4. To investigate which miRNA is predominantly involved in this event, we restored the expression of each miRNA in MCF7-shWISP2 cells using miRNAs precursors (Figure 5E(a)). Cytotoxicity assay showed that only restoration of miR-7-5p was able to significantly restore the CTL-mediated lysis (Figure 5E(b)). These results indicate that the TGF- β -mediated inhibition of mesenchymal cell susceptibility to T-cell-mediated lysis involves miR-7 inhibition.

DISCUSSION

An increasing accumulation of data supports the notion that the tumor stroma plays a crucial role in controlling immune protection and contains many overlapping mechanisms to maintain tumor functional disorder and evasion from antigen-specific immunotherapy. In addition, the complexity of the tumor ecosystem in its deviation of the functions of tumor-infiltrating cells and in its activation of tumor resistance mechanisms is well established. In this context, the aim of this study was to explore the role of WISP2 in the acquisition of cell plasticity and determine whether it interferes with the acquisition of tumor cell resistance to CTL-mediated cytotoxicity, using *in vitro* cultured breast cancer cells as a model. We first employed new approaches, based on the use of ssGSEA and EMT scoring, to illustrate that WISP2 targeting in breast cancer cells inhibited the expression of TGF- β signaling and promoted EMT. This is in agreement with results of western blotting analysis (Supplementary Data 1; Sabbah et al., submitted for publication).

TGF- β , an important regulator of immune functions, suppresses T cell-mediated anti-tumor immunity by directly inhibiting the differentiation and functions of various effector T lymphocytes, such as Th1 cells and cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes.¹⁹ In addition to its direct immune suppression, we here show that the activation of TGF- β signaling, following WISP2 targeting in tumor cells, exerts a dual effect by promoting the EMT phenotype and subsequently impairing CTL effector functions. This finding is in support of our previous studies that showed that Snail-induced EMT confers resistance of target cells to specific CTL activity.^{13,14} As Ag recognition by tumor-specific CD8⁺ T cells strictly correlates with the efficiency of tumor recognition, we sought to gain more insight into WISP2 knockdown-induced impairment of CTL activity by addressing whether WISP2 interferes with the cross-talk between effector and target cells and, subsequently, target recognition. Our data indicate that WISP2 targeting has an inhibitory effect on TAP1, TAP2 and HLA-A2 expression levels, which ultimately resulted in an attenuation of CTL clone reactivity, as revealed by its capacity to secrete

TNF- β . These results emphasize that WISP2 has implications in tumor recognition by immune cells, as well as in tumor cell killing, by shaping its plasticity.

A relationship between EMT and Breast Cancer Stem Cells (BCSCs) has emerged, with evidence that the progression of a mammary epithelial cell through an EMT generates cells with properties of BCSCs.²⁰ In addition, recent studies have provided strong evidence for the critical role of TGF- β signaling in regulating the dynamics of cell populations within malignant breast tumors, achieved by favoring the acquisition of cancer stem cell-like properties.²¹ Indeed, one report shows that the acquisition of stem cell-like properties may be a function of the stromal microenvironment.²² In this regard, we asked whether WISP2 targeting (a) induced the inhibition of target cell susceptibility to specific lysis, (b) interferes with the regulation of transcription factors associated with the self-renewal potential of cancer stem cells, and (c) is able to endow tumor cells with CSC-like features through regulation of miRNA expression.

Our data clearly show a selective induction of KLF4 in WISP2-deficient cells. Several studies have indicated that the poor clinical outcomes of vaccination are primarily caused by mechanisms of immune tolerance, especially within the tumor microenvironment. Here, we report that activation of TGF- β signaling in tumor target cells following WISP2 inhibition drives the evolution of these cells toward immune resistance by acquiring a stem-like phenotype that alters the CTL response.

While KLF4 was found to be highly expressed in more than 70% of breast cancers and functions as an oncogene, the exact mechanism by which KLF4 enhances tumorigenesis and breast cancer cell immunosurveillance evasion remains unknown. Its potent oncogenic role in mammary tumorigenesis likely occurs by maintaining stem cell-like features and by promoting cell migration and invasion.²³ The current studies clearly point to a direct and critical role of TGF- β -dependent induction of KLF4 in the impairment of CTL-mediated tumor cell lysis. Indeed, cancer stem cells have been shown to resist cell death induced by apoptotic and chemo- or radiotherapeutic agents.^{24,25} Here, we provide evidence indicating that KLF4 induced in target cells is an additional stemness transcription factor

playing a crucial role in the regulation of target cell susceptibility to specific lysis. This transcription factor is known to regulate proliferation, differentiation, and apoptosis.²⁶ Other findings support a crucial role for KLF4 in the maintenance of genetic stability by modulating the DNA damage response and repair processes.²⁷ It is tempting to speculate that, in response to microenvironmental cues and their signaling, tumor cells can alter their phenotype and, consequently, modulate tumor heterogeneity and anti-tumor immune responses. Indeed, TGF- β is a critical component of the tumor microenvironment. MCF7-shWISP2 were treated with A83-01, a small molecule inhibitor of TGF- β receptor type I kinase, to ascertain if inhibiting TGF- β signaling could restore target cell phenotypes and their susceptibility to CTLs. Indeed, we showed that such treatment resulted in an inhibition of Smad2 phosphorylation (Supplementary Data 2A), and a partial reversal of the EMT phenotype (Supplementary Data 2A and B). Moreover, TGF- β inhibition in part restored CTL-mediated lysis of MCF7-shWISP2 cells (Supplementary Data 2C), which correlated with a dramatic inhibition in KLF4 transcription (Supplementary Data 2D). These observations suggest that TGF- β antagonists enhance anti-tumor immune responses by blocking the signaling and subsequent targeting of multiple cellular components. It should be emphasized that not only the systemic neutralization, but also the selective blockade of TGF- β signaling may be effective in regulating anti-tumor responses, as A83-01 was effective in suppressing melanoma bone metastases.²⁸

miRNAs have been reported to regulate transcription factors associated with stemness. In this regard, miRNA-145 has been reported to regulate OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells.²⁹ To advance our understanding of how TGF- β signaling regulates the expression of KLF4, we performed miRNAs profiling in untreated and A83-01-treated MCF7-shWISP2 cells. The activation of TGF- β signaling in MCF7-shWISP2 cells was found to regulate some miRNAs involved in the control of several signaling pathways. However, in our experimental system, only the restoration of miR-7-5p could significantly restore CTL-mediated lysis. It has been reported that miR-7-5p expression is reduced in metastatic melanoma-derived cell lines compared

with primary melanoma cells and that, when ectopically expressed, miR-7-5p significantly inhibits melanoma cell migration and invasion.³⁰ In addition, it was suggested that miR-7-5p may represent a novel tumor suppressor miRNA, acting at least in part via its inhibition of oncogenic Akt signaling.³¹ miR-7-5p may therefore represent a novel therapeutic approach to prevent or limit tumor metastasis. Moreover, a very recent study has shown that miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4 expression.²³ Our data point to a novel function of miR-7-5p-regulated KLF4 in the control of mesenchymal tumor cell susceptibility to specific lysis. Thus, our study suggests the existence of a new relationship between WISP2, KLF4, miR-7-5p and resistance to CTL-mediated lysis.

Taken together, our results suggest that WISP2 may orchestrate a dynamic cross-talk between the killer and target cell signaling pathways that play a key role in the control of tumor target sensitivity to CTL-induced cell death.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids

The entire open reading frame of WISP-2/CCN5 cDNA was inserted in the pCEP4-Flag vector (Invitrogen, Illkirch, France), herein referred to as pCEP4-Flag-WISP-2. Small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides for WISP-2/CCN5 were designed by using the Target Finder program (Ambion, Austin, TX). The following sequences were used to construct short hairpin RNA interference (RNAi) vectors in pSilencer (Ambion): sh-WISP-2, 5'-AAGGTGCGTACCCAGCTGTG-3', and shScrambled, 5'-AGTACGTGTACAGGCGCCGT-3', leading to the pSilencer/sh-WISP-2 (MCF7-shWISP2) and the pSilencer/shScrambled vector (MCF7-shScrambled), respectively.

T-cell clone, tumor cell lines and culture conditions

The T-cell-receptor (TCR)-V β 13.6⁺ Heu33 CTL clone was derived from a lung cancer patient tumor as previously described.¹⁷ MCF-7 and derivatives were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies, Carlsbad, CA) and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For MCF7-shWISP2 and MCF7-shScrambled, 100 μ g/ml of Hygromycin-B (Life Technologies) was added to the complete medium.

Cell morphology, actin cytoskeleton and EMT markers staining

Cell morphology images were acquired using $\times 20$ objective by phase contrast microscopy (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Actin filaments were stained by Alexa Fluor 488-coupled Phalloidin. EMT markers were stained with the indicated antibodies (Abs) and nuclei with DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (Life Technologies). Cells were cultured in IBIDI chambers (IBIDI, Biovalley, France) and fixed with 3% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Cells were then permeabilized with 0.4% Triton X-100, and unspecific sites were

blocked with PBS-10%FBS for 15 min at room temperature prior to staining with the indicated Abs. Cells were analyzed with a Zeiss laser scanning confocal microscope, LSM-510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and processed by LSM Image Examiner software (Carl Zeiss).

Western blotting

Adherent cells were lysed on the plate with lysis buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% w/v SDS, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF, 25 μ M leupeptin, 5 mM benzamidine, 1 μ M pepstatin and 25 μ M aprotinin). Cells lysates were resolved by SDS-PAGE electrophoresis (30 μ g/sample) and transferred onto nitrocellulose membranes. After incubation in blocking buffer, the membranes were probed overnight at 4°C with the primary Abs. The labeling was visualized using peroxidase-conjugated secondary Abs and with an ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ). Primary Abs against SNAI1 and E-cadherin were from Cell Signaling (Beverly, MA). Antibodies against SNAI2 and Twist were from Abcam (Cambridge, MA). Antibodies against Vimentin and N-cadherin were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Antibodies against TAP1 and TAP2 were from E. Wiertz (Utrecht, the Netherlands).

Data preprocessing of the breast cancer cell line panel

Two large breast cancer cell line datasets were established using the Affymetrix (Santa Clara, CA) U133A or U133plus2 platform: E-TABM-157 (n=51 samples corresponding to 51 cell lines), and GSE15026 (n=30 samples corresponding to 19 cell lines) were downloaded from Array Express and Gene Expression Omnibus (GEO), respectively. Robust Multichip Average (RMA) normalization was performed for each dataset. The normalized data were combined with the dataset from the present study (n=6 samples from the parental MCF-7 cells, shWISP2-transfected cell line and shScrambled one), and subsequently standardized using ComBat³² to remove the batch effect. The standardized data yielded a dataset of 89 samples derived from 73 cell lines.

Estimation of EMT score

An EMT scoring method was developed using ovarian carcinoma cell line expression profiling. The first step was to establish an EMT signature comparing profiles of E-Cadherin/Cadherin-1 (CDH1) with CDH2-expressing cell lines using a binary regression method (BinReg).³³ In the second step, the BinReg ovarian cancer EMT signature was applied to breast cancer cell lines to predict their EMT status. In the third step, the top 25% (~20 samples) with the highest probabilities for an epithelial or mesenchymal phenotype were used to obtain epithelial- or mesenchymal-specific gene lists for the breast cancer cell lines using Significance Analysis of Microarray (SAM) q-value of 0 and ROC value of 0.85. In the fourth step, Single Sample Geneset Enrichment Analysis (ssGSEA)¹⁵ was employed to compute the enrichment score of a cell line based on the expression of the breast cancer cell line-specific epithelial or mesenchymal signature genes. The EMT score is defined as the normalized subtraction of the mesenchymal from epithelial enrichment score. The EMT score is a precise estimate of the cell line's status as an epithelial or mesenchymal phenotype. A higher or lower EMT score indicates that the cell line exhibits a more mesenchymal or epithelial phenotype, respectively.

Cytotoxicity experiments

The cytotoxic activity of the CTL clone was measured by a conventional 4 h ⁵¹Cr release assay. Several effector: target (E:T) ratios were used on 1000 target cells per well. Supernatants were then transferred to LumaPlate-96 wells (Perkin-Elmer, Waltham, MA), dried, and counted on a Packard TopCount NXT (PerkinElmer, CA). Percent specific cytotoxicity was calculated conventionally.

Surface expression of HLA-A2

HLA-A2 molecule expression on tumor cell lines was quantified by immunofluorescence using MA2.1 mAb for HLA-A2 (produced in the laboratory).

TNF- β production assay

TNF- β release was detected by measuring the cytotoxicity of the culture supernatants on the TNF-sensitive WEHI-164c13 cells with an MTT colorimetric assay as previously described.³⁴

RNA isolation and SYBR-GREEN real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from the samples using TRIzol (Invitrogen). A total of 1 μ g RNA was converted into cDNA by using Taqman Reverse transcription reagent from Applied Biosystems (San Francisco, CA) and mRNA levels were quantified by SYBR-GREEN qPCR (Applied Biosystems). Relative expression was calculated by using the comparative CT method ($2^{-\Delta CT}$).

Flow cytometry and Hoechst assay

Cells were harvested with 0.025% EDTA and double-stained with CD44 (PE) and CD24 (APC) mAbs, both from Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Labeled cells were analyzed on a BD FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Exclusion of Hoechst 33342 dye assay was performed using Hoechst 33342 from Sigma Aldrich (St. Louis, MO) following manufacturer's recommendations. Labeled cells were analyzed on BD LSR Flow Cytometer (BD Biosciences).

A83-01 treatment

Cells were treated with A83-01 (10 μ M), a small molecule inhibitor of TGF- β receptor type I kinase activity (Tocris Bioscience, Bristol, UK), or di-methyl sulfoxide (DMSO) for 72 h.

siRNA transfection

The siRNA used was purchased from Sigma Aldrich. Luciferase (Luc) siRNA was used as a negative control. Subconfluent cells were transfected with siRNA in Opti-MEM, using RNAiMax reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The silencing of KLF4 was assessed by western blotting 48 h after transfection using appropriate Abs (Cell Signaling).

Immunohistochemical staining for E-cadherin, Twist, TGF- β , SMAD2/3 and KLF4 expression

Immunohistochemistry on human breast cancer serial sections was performed as previously described.³⁵ The samples were incubated with mAbs against E-Cadherin (Cell Signaling), Twist (Abcam), TGF- β (Abcam), SMAD2/3 (Abcam) and KLF4 (Sigma Aldrich). The signal was revealed with the DAB HistoMouse-Max kit (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA).

MicroRNA (miR) isolation and detection and microRNA microarray experiment

TRIzol (Invitrogen) was used to extract miRNAs. miRNA microarray analysis was conducted using Agilent human miRNA microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Rosetta resolver software (Rosetta Biosoftware, Seattle, WA) was used for analysis. DNase I-treated total RNA (8 ng) was subjected to qRT-PCR analysis using TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). miRNAs were detected and quantified by using specific miRNA primers from Ambion, the expression levels of mature miRNAs were evaluated using the comparative Ct method (2-DCt). Transcript levels of RNU44 were used as an endogenous control.

Statistical analyses

Data were analyzed with GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA). A Student's t-test was used for single comparisons. Data were considered statistically significant when $p < 0.05$.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer, l'Association de Recherche sur le Cancer, A*STAR Institute of Molecular Cell Biology, Cancer

Science Institute National University of Singapore core grants, CRP-Santé (REC-LHCE-2009-0201) and Fondation Cancer, Luxembourg (FC/2012/02) to BJ.

REFERENCES

- 1 Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ & Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; **3**: 991-998.
- 2 Anichini A, Molla A, Mortarini R, Tragni G, Bersani I, Di Nicola M *et al.* An expanded peripheral T cell population to a cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined, melanocyte-specific antigen in metastatic melanoma patients impacts on generation of peptide-specific CTLs but does not overcome tumor escape from immune surveillance in metastatic lesions. *J Exp Med* 1999; **190**: 651-667.
- 3 Chouaib S. Integrating the quality of the cytotoxic response and tumor susceptibility into the design of protective vaccines in tumor immunotherapy. *J Clin Invest* 2003; **111**: 595-597.
- 4 Hamai A, Benlalam H, Meslin F, Hasmim M, Carre T, Akalay I *et al.* Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune? *Tissue Antigens* 2010; **75**: 1-8.
- 5 Holzel M, Bovier A & Tuting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 365-376.
- 6 Yang J & Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008; **14**: 818-829.
- 7 Banerjee S, Saxena N, Sengupta K, Tawfik O, Mayo MS & Banerjee SK. WISP-2 gene in human breast cancer: estrogen and progesterone inducible expression and regulation of tumor cell proliferation. *Neoplasia* 2003; **5**: 63-73.
- 8 Fritah A, Saucier C, De Wever O, Bracke M, Bieche I, Lidereau R *et al.* Role of WISP-2/CCN5 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 1114-1123.
- 9 Banerjee S, Dhar G, Haque I, Kambhampati S, Mehta S, Sengupta K *et al.* CCN5/WISP-2 expression in breast adenocarcinoma is associated with less frequent progression of the disease and suppresses the invasive phenotypes of tumor cells. *Cancer research* 2008; **68**: 7606-7612.

- 10 Sabbah M, Prunier C, Ferrand N, Megalophonos V, Lambein K, De Wever O *et al.* CCN5, a novel transcriptional repressor of the transforming growth factor beta signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2011; **31**: 1459-1469.
- 11 Dhar G, Banerjee S, Dhar K, Tawfik O, Mayo MS, Vanveldhuizen PJ *et al.* Gain of oncogenic function of p53 mutants induces invasive phenotypes in human breast cancer cells by silencing CCN5/WISP-2. *Cancer research* 2008; **68**: 4580-4587.
- 12 Frewer KA, Sanders AJ, Owen S, Frewer NC, Hargest R & Jiang WG. A role for WISP2 in colorectal cancer cell invasion and motility. *Cancer Genomics Proteomics* 2013; **10**: 187-196.
- 13 Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, Andre F, De Cremoux P *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer research* 2013; **73**: 2418-2427.
- 14 Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, Thierry JP, Mami-Chouaib F *et al.* EMT impairs breast carcinoma cell susceptibility to CTL-mediated lysis through autophagy induction. *Autophagy* 2013; **9**.
- 15 Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; **17**: 98-110.
- 16 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 15545-15550.
- 17 Dorothee G, Echchakir H, Le Maux Chansac B, Vergnon I, El Hage F, Moretta A *et al.* Functional and molecular characterization of a KIR3DL2/p140 expressing tumor-specific cytotoxic T lymphocyte clone infiltrating a human lung carcinoma. *Oncogene* 2003; **22**: 7192-7198.
- 18 Hasmim M, Noman MZ, Lauriol J, Benlalam H, Mallavialle A, Rosselli F *et al.* Hypoxia-dependent inhibition of tumor cell susceptibility to CTL-mediated lysis involves NANOG induction in target cells. *J Immunol* 2011; **187**: 4031-4039.
- 19 Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK & Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; **24**: 99-146.

- 20 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; **133**: 704-715.
- 21 Liu Z, Bandyopadhyay A, Nichols RW, Wang L, Hinck AP, Wang S *et al.* Blockade of Autocrine TGF-beta Signaling Inhibits Stem Cell Phenotype, Survival, and Metastasis of Murine Breast Cancer Cells. *J Stem Cell Res Ther* 2012; **2**: 1-8.
- 22 Reiman JM, Knutson KL & Radisky DC. Immune promotion of epithelial-mesenchymal transition and generation of breast cancer stem cells. *Cancer research* 2010; **70**: 3005-3008.
- 23 Okuda H, Xing F, Pandey PR, Sharma S, Watabe M, Pai SK *et al.* miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer research* 2013; **73**: 1434-1444.
- 24 Rebucci M & Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 2013; **85**: 1219-1226.
- 25 Shekhani MT, Jayanthi AS, Maddodi N & Setaluri V. Cancer stem cells and tumor transdifferentiation: implications for novel therapeutic strategies. *Am J Stem Cells* 2013; **2**: 52-61.
- 26 Yang Y, Goldstein BG, Chao HH & Katz JP. KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; **4**: 1216-1221.
- 27 El-Karim EA, Hagos EG, Ghaleb AM, Yu B & Yang VW. Kruppel-like factor 4 regulates genetic stability in mouse embryonic fibroblasts. *Mol Cancer* 2013; **12**: 89.
- 28 Mohammad KS, Javelaud D, Fournier PG, Niewolna M, McKenna CR, Peng XH *et al.* TGF-beta-RI kinase inhibitor SD-208 reduces the development and progression of melanoma bone metastases. *Cancer research* 2011; **71**: 175-184.
- 29 Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA & Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 2009; **137**: 647-658.
- 30 Giles KM, Brown RA, Epis MR, Kalinowski FC & Leedman PJ. miRNA-7-5p inhibits melanoma cell migration and invasion. *Biochemical and biophysical research communications* 2013; **430**: 706-710.

-
- 31 Fang Y, Xue JL, Shen Q, Chen J & Tian L. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; **55**: 1852-1862.
- 32 Johnson WE, Li C & Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007; **8**: 118-127.
- 33 Gatz ML, Lucas JE, Barry WT, Kim JW, Wang Q, Crawford MD *et al.* A pathway-based classification of human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**: 6994-6999.
- 34 El Hage F, Stroobant V, Vergnon I, Baurain JF, Echchakir H, Lazar V *et al.* Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 10119-10124.
- 35 Magnon C, Opolon P, Ricard M, Connault E, Ardouin P, Galaup A *et al.* Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1alpha-mediated tumor apoptotic switch. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1844-1855.
- 36 Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006; **10**: 515-527.

Figure 2.

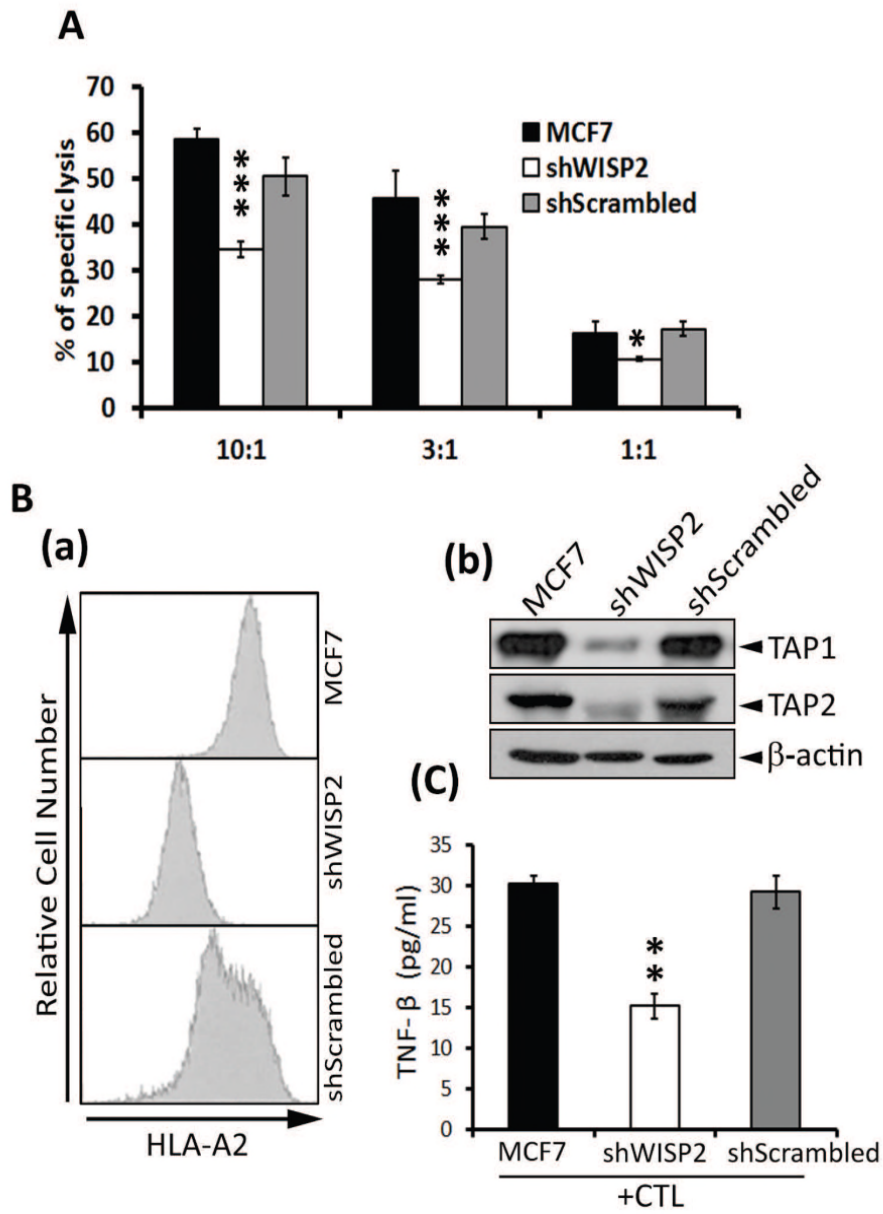


Figure 3.

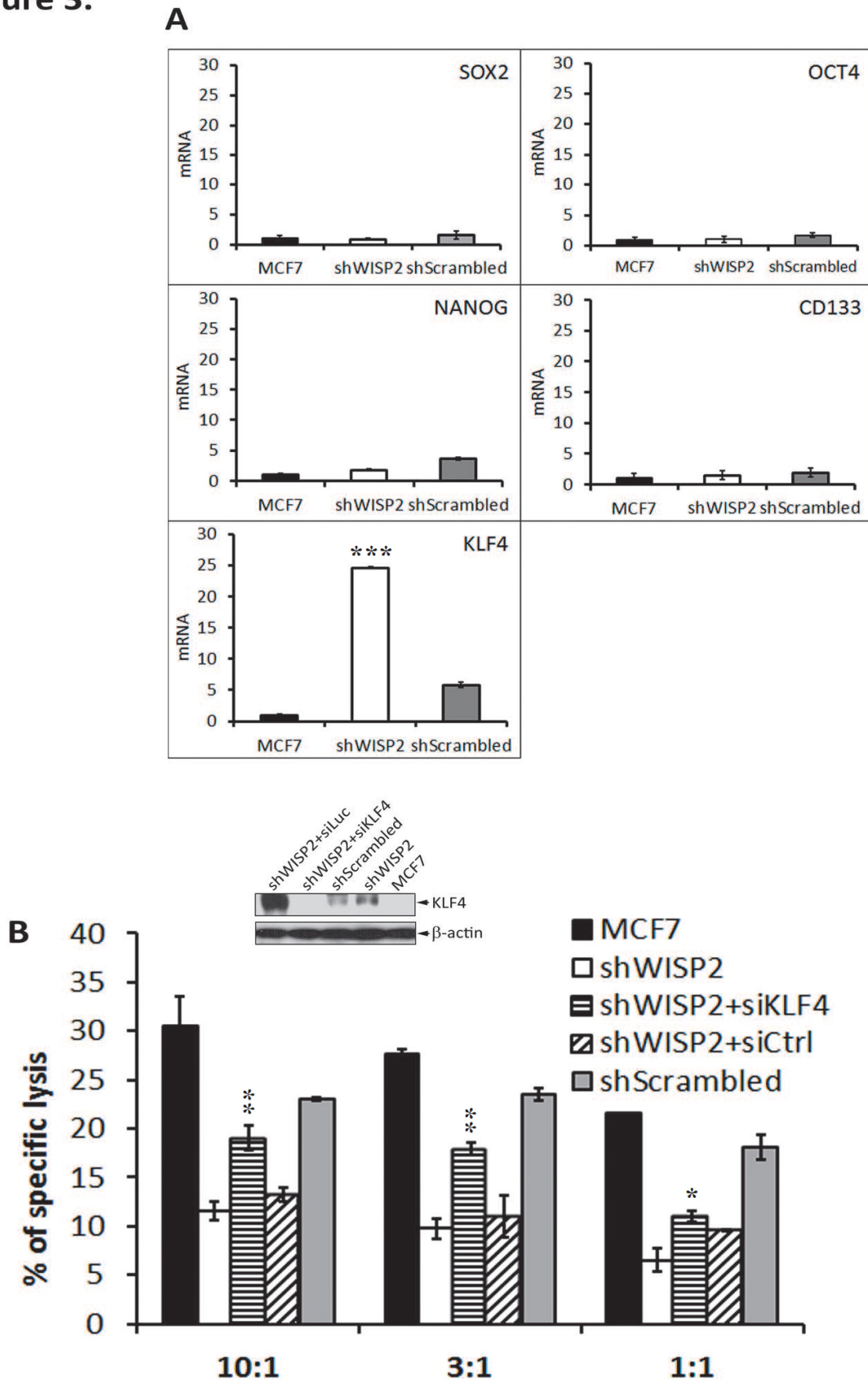


Figure 4.

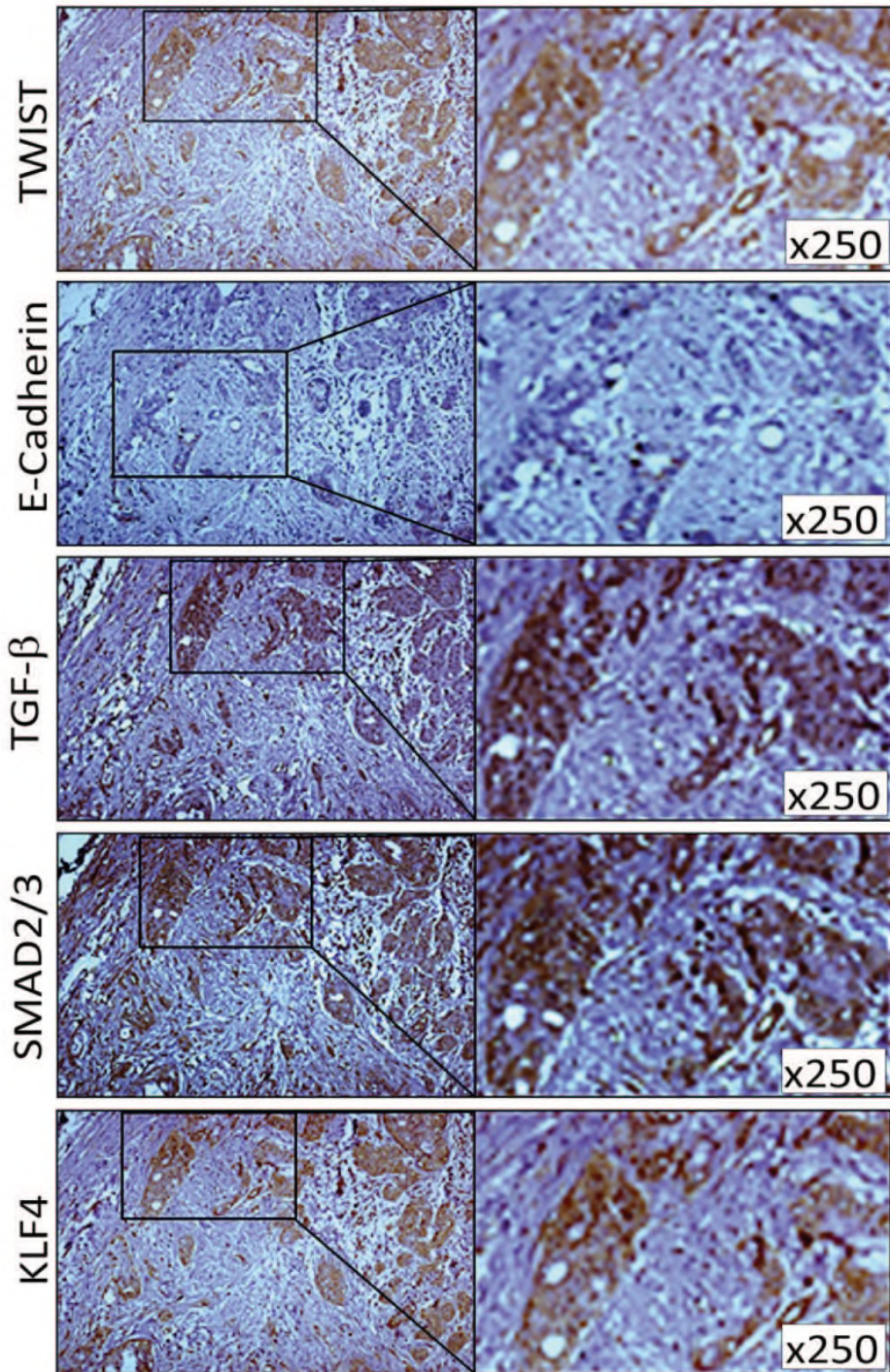


Figure 5A, B, C and D

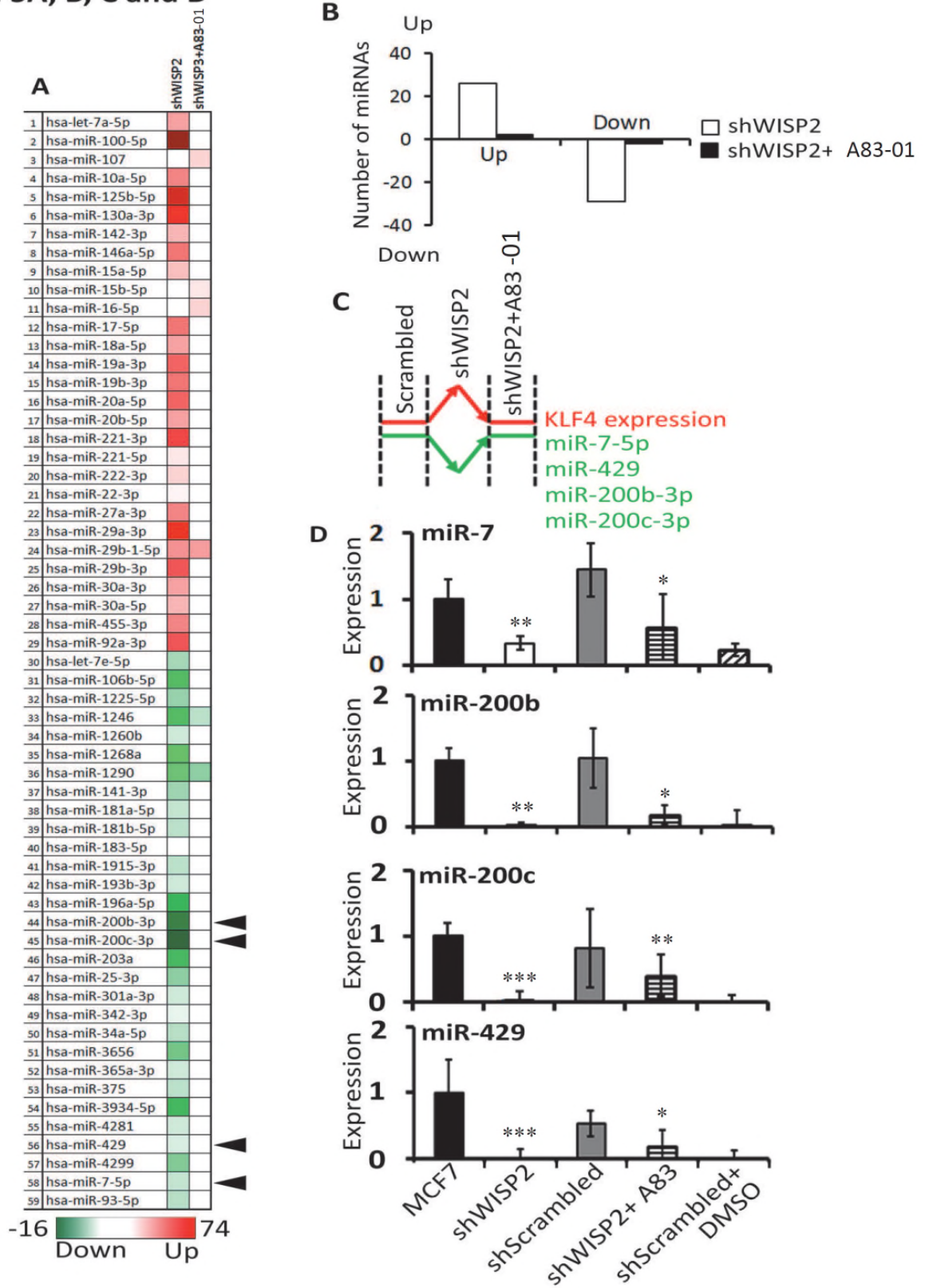
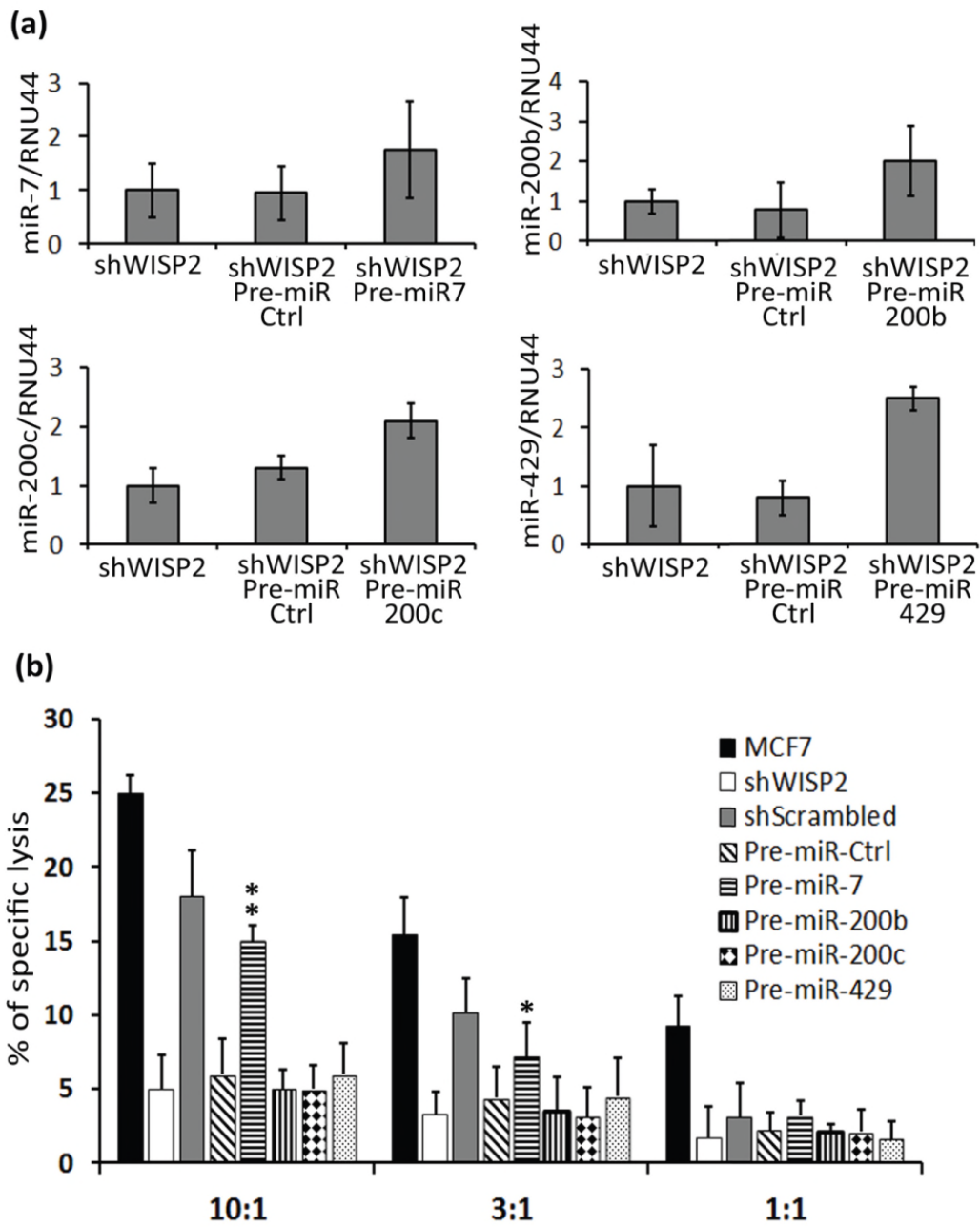
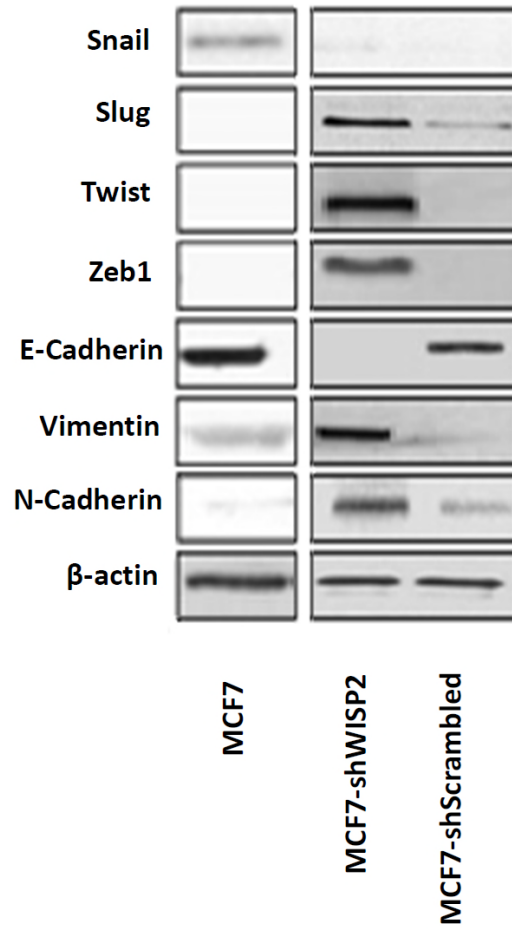


Figure 5E



Supplementary Data 1



Supplementary data 2

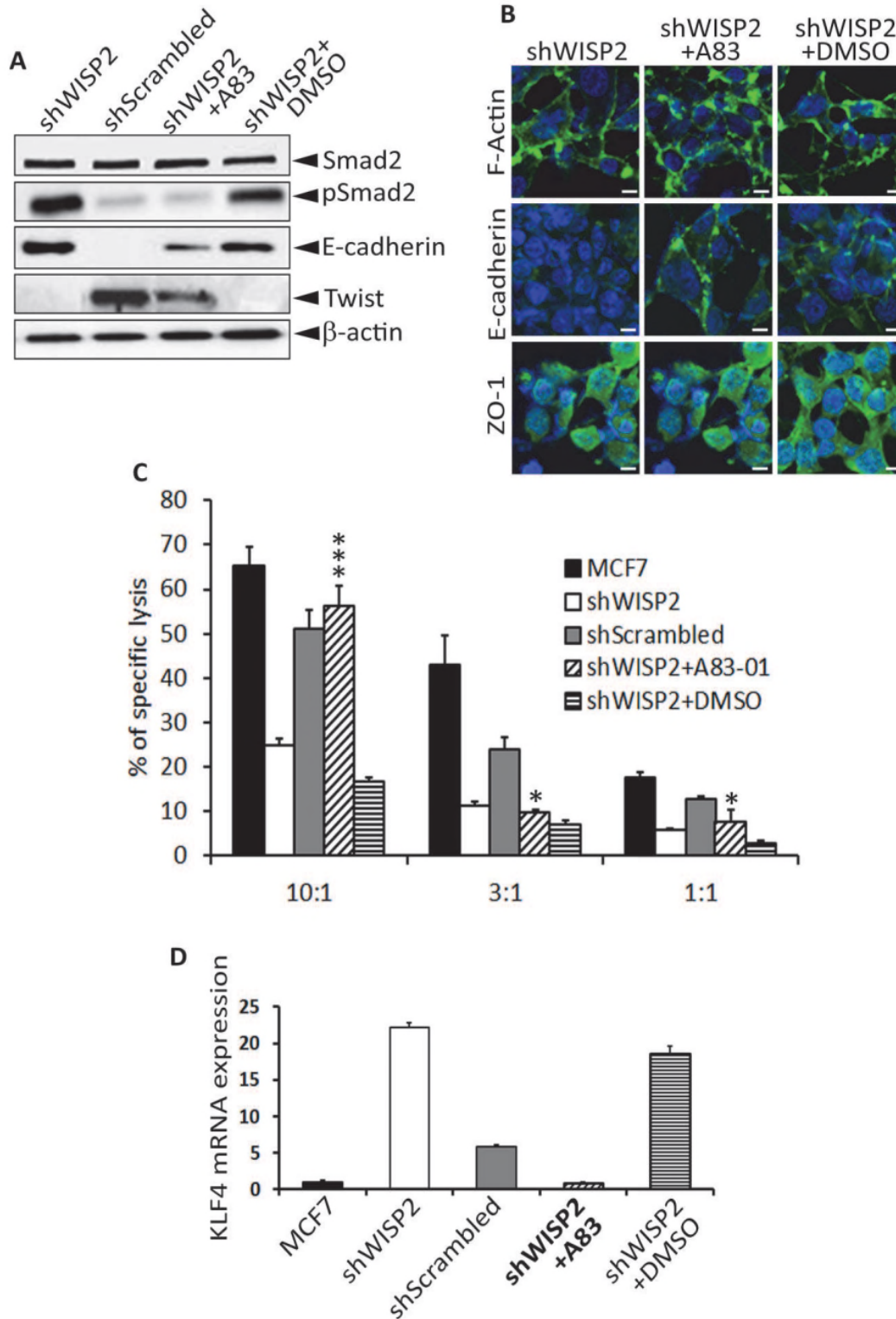


FIGURE LEGENDS**Figure 1: Targeting *WISP2* activates *TGF- β* signaling and induces EMT as revealed by immunofluorescence, ssGSEA and EMT score**

(A) Immunofluorescence staining of F-actin and epithelial markers (E-cadherin, β -catenin, Zonula Occludens-1 (ZO-1), and cytokeratin 18). Nuclei were stained with DAPI (blue), Bar = 20 μ m. (B). Bar plot of estimated *TGF- β* signaling activity in parental MCF7, MCF7-shScrambled and MCF7-shWISP2. Colors of the bar indicate the gene sets used and the y-axis indicates the enrichment score as computed by Single Sample Geneset Enrichment Analysis (ssGSEA). (C). Bar plot of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) score of breast cancer cell lines aligned from the most epithelial (EMT score = -1.0) to the most mesenchymal (EMT score = +1.0). Various breast cancer cell lines are named above or below the bar plot. Positions of parental MCF7, MCF7-shScrambled, and MCF7-shWISP2 are indicated in black (arrows). Breast cancer molecular subtypes were assigned to each line according to Neve *et al.*³⁶ Maroon, red, and blue colors represent Basal-A, Basal-B, and Luminal subtypes, respectively.

Figure 2: Down-regulation of *HLA-A2*, *TAP1/2* expression and alteration of CTL reactivity by targeting *WISP2*

(A) Cytotoxicity was determined by a conventional 4 h ⁵¹Cr release assay at different effector: target (E:T) ratios on 1000 target cells per well. Bars indicate the mean, and the error bars indicate the standard deviations. (B) (a) Decrease in *HLA-A2* molecule expression on the surfaces of the EMTed cells. (b) Western blot analysis of *TAP1* and *TAP2* expression using the indicated Abs. (c) *TNF- β* production by the T cell clone in response to tumor cell stimulation. Significant P-values are indicated by asterisks (* P=0.03; ** P=0.003; *** P<0.001).

Figure 3: Selective induction of KLF4 following WISP2 targeting and its silencing alleviates MCF7-shWISP2 resistance to CTLs

(A) RT-qPCR showing relative mRNA expression of stemness markers. Values were normalized to 18s rRNA levels. (B) CTL-mediated cytotoxicity toward tumor cells at different effector: target (E:T) ratios. Western blot analysis of KLF4 expression in untransfected cells and in cells transfected with either KLF4 or Luciferase siRNAs. Significant P-values are indicated by asterisks (* P=0.03; ** P=0.003; *** P<0.001).

Figure 4: Coexpression of EMT markers (Twist, E-Cadherin), TGF- β signaling pathway proteins (TGF- β , SMAD2/3) and KLF4 in human breast cancer biopsies

Serial sections from human breast cancer biopsies were stained using immunohistochemistry. Right panel shows an enlarged view of the boxed areas in the left panel at $\times 250$ magnification.

Figure 5: The impact of TGF- β -induced EMT on miRNA expression

(A) Heat map of miRNAs regulated by TGF- β signaling pathway in cell lines. Red signifies upregulation, whereas green signifies downregulation. (B) Number of miRNAs up- and down-regulated with or without A83-01 (A83) treatment. (C) Relationship between KLF4 expression and miR-7-5p, miR-429 miR-200b-3p and miR-200c-3p expression (indicated with bold arrows in A). (D) miRNAs expression was monitored by TaqMan qRT-PCR. Expression levels of RNU44 were used as an endogenous control. (E) (a) Control of Pre-miRNAs-precursors transfection quality by TaqMan qRT-PCR. Expression levels of RNU44 were used as an endogenous control. (E) (b) CTL-mediated lysis of tumor cells at different effector: target (E:T) ratios. Bars indicate mean and errors indicate the standard deviations. Significant P-values are indicated by asterisks (* P=0.03; ** P=0.003; *** P<0.001).

Supplemental Figure Legends**Supplemental Figure S1: *Western blot analysis of EMT markers***

The expression of each EMT marker was determined using the indicated antibodies.

Supplemental Figure S2: *Inhibition of TGF- β signaling reverses partially EMT phenotype, KLF4 expression and restores susceptibility to CTLs*

(A) Western blot analysis of TGF- β signalling pathway proteins and EMT markers. (B) Immunofluorescence staining of actin and epithelial markers (E-cadherin and ZO-1). Nuclei were stained with DAPI (blue). (C) Cytotoxicity was determined by a conventional 4 h ^{51}Cr release assay at different ratios. Bars indicate the mean, and the error bars indicate the standard deviations. (D) RT-qPCR showing relative mRNA expression of KLF4. Values were normalized to 18s rRNA levels. Significant P-values are indicated by asterisks (* P=0.03; ** P=0.003; *** P<0.001).

Supplementary results (data not shown in the paper):

We have examined the effect of WISP2 targeting-induced TGF- β signaling on the acquisition of stem cell-like properties such as the expression of stem cell transcription factors SOX2, OCT4, Nanog, CD133, and KLF4. Results of qRT-PCR show that there is no increase in the expression of these factors in shWISP2-mesenchymal cell line with the exception of KLF4, which is strongly overexpressed in this cell line as compared to parental MCF7 and sh-Scrambled ones (Figure 3A). Similarly, very recent studies have shown that KLF4 alone is able to induce stem cell like properties (Leng Z et al., 2013; Okuda H et al., 2013). Thus, we asked whether the expression of the transcription factor KLF4 alone could be able to promote stem cell like characteristics in our mesenchymal cell line. Thereby, we have studied some characteristics of BCSCs including Hoechst dye exclusion. As shown in the Figure below, the EMTed cell line shWISP2 is characterised by a side population two times more abundant than those of parental MCF7 and shScrambled epithelial cell lines. Furthermore, analysis of CD44 and CD24 expression show that shWISP2 cell line has a CD44^{high}/CD24^{low} profile characterising especially BCSC and that its percentage of CD44⁺ cell population is much higher than that of parental and shScrambled MCF7 cell lines (Figure below). These results suggest that WISP2 targeting-induced TGF-beta signaling activation confers stem cell-like properties to MCF7 EMTed cell line, essentially through positive regulation of KLF4 expression.

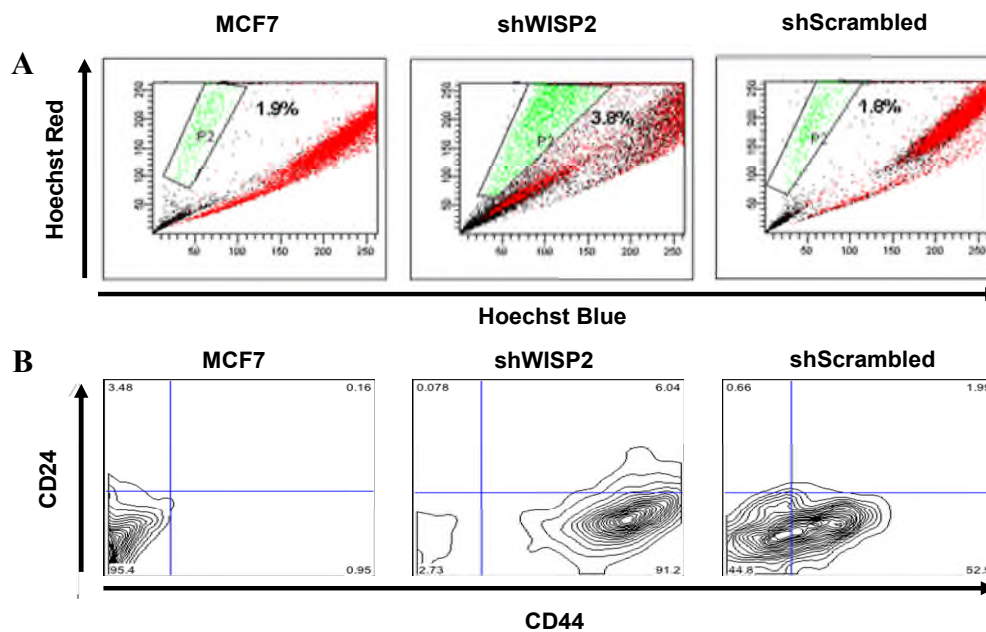


Figure legend: TGF- β -induced EMT regulates stem-cell-like properties

(A) Side population (SP) analysis of epithelial and EMTed cell lines using the DNA-binding dye (Hoechst 33342). The SP cells are indicated within the gate. (B) Analysis of CD24 and CD44 expression patterns in cell lines by FACS. Anti-CD24 antibody labelled with APC and anti-CD44 antibody labelled with PE were applied to the analysis. An isotype control corresponding to each cell line was used.



Discussion générale

Le cancer du sein chez les femmes est un problème majeur de santé publique dans le monde. Il est le plus fréquent chez les femmes, que ce soit dans les pays développés ou ceux en voie de développement. Un sur dix des cancers diagnostiqués chaque année dans le monde est un cancer du sein chez la femme. Il est également la principale cause de décès d'un cancer chez les femmes (Ferlay et al., 2010).

La classification des tumeurs mammaires en sous-types est d'une importance capitale pour l'étude de l'étiologie du cancer du sein, pour prédire l'évolution clinique et pour la prise de décisions relatives aux traitements de ce type de cancer. En effet, la distinction entre les différents sous-types de cancer du sein pourrait être faite sur la base des caractéristiques phénotypiques ou génotypiques de la tumeur, tels que le stade de la tumeur, son grade, l'histologie et le profil génomique. Cette distinction qui donne naissance à une classification du cancer du sein en sous-types se traduit par des différences au niveau des résultats cliniques (Phipps et al., 2010).

La technique du profilage de l'expression des gènes a été utilisée pour identifier et pour distinguer les sous-types de cancer du sein (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Farmer et al., 2005). Ces équipes de recherche (cités en références) ont identifié cinq sous-types de cancer du sein avec des profils moléculaires distincts: luminal A, luminal B, groupe HER2⁺, basal-like, et normal-like (aussi appelé non classé). Les principaux facteurs discriminants entre ces sous-types reflètent l'origine cellulaire de ces tumeurs au niveau du sein: les sous-types luminal A et luminal B expriment des gènes caractéristiques des cellules d'origine luminaire (en particulier l'expression des récepteurs aux œstrogènes (ER)), tandis que les autres sous-types HER2⁺, basal-like et normal-like n'expriment pas ces récepteurs.

En effet, au sein du groupe des tumeurs luminal-like, le sous-type luminal B à l'opposé du sous-type luminal A, est caractérisé par un niveau élevé d'expression des gènes spécifiques au groupe des tumeurs lumineuses, par exemple: ER, GATA3, HNF3A (hepatocyte nuclear factor 3 alpha), XBP1 (X-box-binding protein 1), et un niveau faible d'expression des gènes de prolifération, par exemple, la cycline B1 et Ki-67 (prolifération-associated antigen) (Sorlie et al., 2001). Au sein du groupe des tumeurs non-lumineuses, on distingue les tumeurs exprimant fortement HER2, et les tumeurs basal-like présentant un profil d'expression génique plus semblable à celui des cellules épithéliales basales, incluant généralement une sous-expression des ER, des PR (récepteurs à la progestérone) et celle de la protéine HER2, ce phénotype donc appelé triple-négatif est caractérisé par l'expression de l'EGFR et/ou des cytokératines basales (la cytokératine 5/6) (Nielsen et al., 2004).

Les différences génotypiques observées entre ces sous-types se traduisent par des profils cliniques distincts. En effet, le fait que le sous-type luminal A soit ER⁺ permet aux tumeurs appartenant à ce sous-type d'être associées à un stade précoce au diagnostic et à un pronostic favorable (Stark et al., 2008). En comparaison, les tumeurs basal-like et HER2⁺ sont plus susceptibles d'être à un stade avancé, d'être de haut grade et par conséquent, elles sont associées à un faible taux de survie (Sorlie et al., 2001, Hu et al., 2006). Le pronostic des patientes portant le sous type luminal B semble être plus faible que celui des patientes portant le sous-type luminal A. Cependant, l'ensemble des patientes du sous-type luminal peut bénéficier du traitement hormonal ciblé. Bien que les patientes HER2⁺, basal-like, et normal-like possèdent un faible pronostic comparées aux patientes du sous-type luminal, des études ont montré qu'elles peuvent répondre plus favorablement à la chimiothérapie néoadjuvante basée sur l'anthracyclines (Carey et al., 2007).

La lignée MCF7 constituant notre modèle expérimental se caractérise par l'expression des récepteurs nucléaires aux œstrogènes (ER) et des récepteurs nucléaires à la progestérone (PR) et par l'absence d'amplification de HER2. Elle appartient donc au sous-type luminal (Lacroix, 2006). Dans la lignée cellulaire SNAI1-6SA, l'équipe de Dr. Larsen A. a mis en lumière une absence de l'expression des ER et des PR et une faible diminution de celles-ci dans la lignée SNAI1 (Ouelaa-Benslama et al., 2012). En ce qui concerne la lignée 2101 sélectionnée suite à sa résistance au TNF- α après un traitement prolongé, une étude au sein de notre laboratoire a montré que cette lignée exprime les ER-alpha de façon comparable à la lignée parentale MCF7. Néanmoins, les lignées cellulaires MCF7 et 2101 répondent différemment au traitement par les ER-alpha. Comme la lignée 2101 porte un p53 muté, cette étude a suggéré un lien entre l'effet des ER-alpha et la fonction de p53 (Lewandowski et al., 2005). Quant à la lignée shWISP2, l'équipe de Dr. Sabbah M. a révélé que l'inhibition de WISP2 induit une perte de l'expression des ER et des PR et que la prolifération de ces cellules en comparaison à leur correspondante sh-Scrambled est œstradiol-indépendante (Fritah et al., 2008). L'ensemble de ces études renforce le lien décrit entre la perte de l'expression des ER et des PR et l'induction de l'EMT (Al Saleh et al., 2011; Wik et al., 2013; van der Horst et al., 2012).

Les femmes qui ont eu un cancer du sein ont un risque environ deux à six fois plus élevé de développer un deuxième cancer du sein et 25% plus de risque de développer un deuxième cancer non-mammaire en comparaison avec les femmes qui ne l'ont jamais eu (Mellemkjaer et al., 2006). Les métastases du cancer du sein peuvent apparaître dans plusieurs organes (côlon/rectum, os, endomètre, ovaire, rein, poumons, peau (mélanome), sang (leucémies),...) (Mellemkjaer et al., 2006; Raymond and Hogue, 2006; Trentham-Dietz et al., 2007).

En ce qui concerne les traitements anti-cancer mammaire métastatique, le trastuzumab, un

anticorps monoclonal dirigé contre HER-2/neu, a d'abord été évalué en complément à la chimiothérapie et a été prouvé capable de prolonger la survie (Slamon et al., 2001).

Le lapatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, administré par voie orale contre l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et HER-2/neu à la fois, a été montré récemment capable de prolonger la survie lorsqu'il est administré avec la capécitabine chez les patientes dont la maladie a progressé malgré l'utilisation du trastuzumab et malgré un traitement antérieur par l'anthracycline et le taxane (Geyer et al., 2006). Le lapatinib représente ainsi un nouvel espoir pour les patientes portantes des métastases HER-2/neu-positives. Malgré ces progrès médicaux inédits, les métastases, la rechute et la résistance à ces traitements demeurent les principales causes de décès des patientes atteintes du cancer du sein. Le manque de thérapies efficaces appelle à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du cancer mammaire.

Il est de plus en plus accepté que le processus de l'EMT puisse doter les cellules cancéreuses de capacités migratoires et invasives associées au pouvoir métastatique (Thiery et al., 2009; Polyak and Weinberg, 2009). Par ailleurs, plusieurs études ont convergé ces dernières années vers le soutien de l'idée selon laquelle toutes les cellules cancéreuses dans une tumeur donnée ne sont pas égales en termes de leur potentiel initiateur de tumeurs. Le paradigme émergent repose sur le fait que la progression tumorale est entraînée par une sous-population de cellules tumorales appelée cellules souches cancéreuses (CSC) ou des cellules initiatrices de tumeurs. Ces dernières se caractérisent par deux propriétés: la capacité de s'auto-renouveler et la capacité de régénérer une hétérogénéité phénotypique de la tumeur parentale (McDermott and Wicha, 2010). Les cellules souches cancéreuses sont impliquées à la fois dans l'initiation et la suspension de la croissance de la tumeur primitive et dans la génération et l'établissement des métastases dans des sites distants (Abraham et al., 2005; Sheridan et al., 2006). Alors que la notion de « cellules souches cancéreuses » ne précise pas la cellule d'origine pour un cancer particulier, il est raisonnable de supposer que les tumeurs peuvent provenir de la transformation des cellules souches normales des tissus adultes qui ont acquis des capacités d'auto-renouvellement (McDermott and Wicha, 2010). Dans le cas du cancer du sein, la tumeur pourrait provenir de la transformation des cellules souches normales de la glande mammaire (Dontu et al., 2003; Campbell and Polyak, 2007; Stingl and Caldas, 2007; Melchor and Smalley, 2008).

De manière intéressante, des études récentes ont établi un lien crucial entre le passage des cellules tumorales épithéliales par l'EMT et l'acquisition de propriétés moléculaires et fonctionnelles de cellules souches cancéreuses (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). En plus de sa capacité à conférer

un potentiel migratoire et invasif, l'induction de l'EMT dans des cellules tumorales mammaires augmente significativement leur capacité à s'auto-renouveler et à initier des tumeurs tout en exprimant des marqueurs de cellules souches cancéreuses typiquement associés aux cellules souches cancéreuses du sein (Mani et al., 2008). Notre étude montre également que l'induction de l'EMT dans la lignée épithéliale parentale (MCF7) que ce soit via le traitement par le TNF- α , via la transfection par SNAIL sauvage ou constitutivement actif (SNAIL et SNAIL-6SA) ou via l'inactivation du gène WISP2/CCN5 s'accompagne de l'acquisition de propriétés de cellules souches cancéreuses notamment celles qui caractérisent plus spécifiquement les cellules souches cancéreuses du sein: un profil CD24⁻/CD44⁺, une exclusion du Hoechst, une activité ALDH élevée, la formation de sphéroïdes et l'initiation de tumeurs in-vivo. Notre étude établit également que ces propriétés sont corrélées au score de l'EMT. Assurément, plus le score EMT est élevé plus l'activité ALDH et la population CD44⁺ sont élevées, et la taille des sphéroïdes formées et celle de la tumeur in-vivo sont grandes. C'est le cas des lignées mésenchymateuses 2101 et sh-WISP2 (caractérisées par un score EMT très élevé) comparées aux lignées SNAIL et SNAIL-6SA (caractérisée par un score EMT intermédiaire) (Akalay et al., 2013a; Akalay et al. manuscript submitted).

Concernant les marqueurs de cellules souches cancéreuses (à savoir: SOX2, OCT4, KLF4, Nanog et CD133), ils sont surexprimés dans les lignées mésenchymateuses 2101, SNAIL et SNAIL-6SA. Toutefois, la lignée mésenchymateuse MCF7-shWISP2 appartenant au deuxième modèle de notre étude se caractérise par une surexpression du marqueur KLF4 uniquement, d'où notre hypothèse selon laquelle TGF- β induit des propriétés de cellules souches cancéreuses en partie via la régulation de l'expression de KLF4 (Akalay et al., manuscript submitted). L'utilisation de la drogue A83-01 ciblant le récepteur I du TGF- β diminue l'expression de KLF4 d'une façon significative démontrant la capacité de la voie TGF- β à réguler l'expression de celui-ci (Akalay et al., manuscript submitted). Une étude récente vient renforcer notre hypothèse en décrivant un lien entre la voie de signalisation TGF- β , plus particulièrement l'implication du TGF- β -RI dans la régulation de l'expression de KLF4. En effet, cette étude a établi que la phosphorylation de KLF4 nécessite la participation de Smad et p38 MAPK suite à l'activation de TGF- β -RI (Li et al., 2010). Néanmoins, il existe des résultats qui ne s'accordent pas avec ces études. Il s'agit des travaux ayant montré que le TGF- β stimule la dégradation de KLF4 afin d'induire l'expression de Slug dans un modèle de cancer de la prostate (Liu et al., 2012).

Notre étude a établi un lien entre la régulation de l'expression de KLF4, via la signalisation TGF- β , et l'inhibition de l'expression de certains miRNAs (miR-7, miR-200b, miR200c et miR429) (Akalay et al., manuscript submitted). Notre résultat s'accorde avec une étude très récente montrant

que le miR-7 supprime les métastases cérébrales dues aux cellules souches cancéreuses du sein (BCSC) via la modulation de l'expression de KLF4 (Okuda et al., 2013).

Au moment où les thérapies anti-cancer mammaire classiques n'étaient pas très efficaces contre la progression tumorale, l'immunothérapie à base de vaccination a commencé à émerger dans le but d'améliorer ces traitements, plus spécifiquement contre les cancers du sein Her2/neu positifs. Ainsi, plusieurs peptides immunogéniques provenant de la séquence HER-2/neu ont été identifiés et utilisés avec succès pour générer une réponse T spécifique *in-vitro* et *in-vivo* (Fisk et al., 1995; Peoples et al., 1995; Nagata et al., 1997; Kono et al., 1998; Disis et al., 2003; Singh and Paterson, 2006). Grâce au haut degré d'homologie existant entre HER2 et neu chez le rat (~ 89%), ces protéines doivent posséder plusieurs épitopes CMH de classe I et de classe II afin d'induire une réponse immunitaire efficace. La vaccination par l'ADN plasmidique codant pour toute la séquence de HER-2/neu ou avec la protéine devrait théoriquement avoir l'avantage de présenter à la fois les épitopes du CMH de classe I et de classe II, et ainsi d'induire une réponse immunitaire anti-HER2/neu.

La plupart des preuves expérimentales soutiennent l'idée que l'éradication de la tumeur repose principalement sur la réactivité des lymphocytes T (Schuler and Blankenstein, 2003). Dans la plupart des cas, l'inhibition de la croissance tumorale repose sur l'activité lytique des lymphocytes TCD8⁺ (Boon et al., 1994), tandis que les lymphocytes T CD4⁺ activés par la présentation directe des antigènes tumoraux par les APC sont nécessaires pour soutenir la réponse des lymphocytes T CD8⁺ (Pericle et al., 1994).

Le Dr. Reilly et ses collègues ont constaté que, bien que des souris transgénique capables de développer un cancer mammaire (FVB/NeuN) soient capables de générer des CTL contre HER-2/neu après la vaccination neu-spécifique, il y avait peu ou pas de vaccin induisant des IgG neu-spécifiques chez des souris vaccinées à l'âge de 8 semaines (Reilly et al., 2000). En outre, malgré la faiblesse de la croissance des tumeurs transplantées exprimant neu dans les souris vaccinées en comparaison aux souris contrôles, la croissance tumorale n'a pas été complètement éradiquée (Reilly et al., 2000). Ainsi, l'échappement tumoral aux stratégies de vaccination menace encore la réussite des immunothérapies anti-cancer du sein HER2⁺.

Au cours des dernières années, il y a eu une progression dans la compréhension des mécanismes d'échappement des cellules tumorales à l'immuno-surveillance. L'un des plus importants de ces mécanismes est l'altération de l'expression de la molécule HLA sur la membrane des cellules tumorales. En effet, les cellules tumorales peuvent échapper à la lyse par les CTLs via la perte de l'ensemble ou d'une partie des molécules HLA-I. Les CTLs ne peuvent donc pas détecter l'antigène tumoral. Ce phénomène est associé à l'invasion et aux métastases. Dans un deuxième temps, les

cellules tumorales déficientes en HLA-I sont théoriquement susceptibles à la lyse par les cellules NK. Si elles ne le sont pas, c'est parce qu'un mécanisme d'échappement aux NK est adopté par les cellules tumorales sous-exprimant HLA-I. Ce mécanisme est encore méconnu. Dans le cadre de notre étude, une diminution de l'expression de la molécule HLA-A2 a été observée dans les lignées cellulaires mésenchymateuses en comparaison avec leurs correspondantes épithéliales (Akalay et al., 2013a; Akalay et al., manuscript submitted). Cela provoque un déficit au niveau de la reconnaissance de la cellule tumorale par les CTLs. Ce constat a été renforcé par le test de sécrétion de TNF- β confirmant le déficit au niveau de la reconnaissance des cellules mésenchymateuses par les CTLs (Akalay et al., 2013a; Akalay et al., manuscript submitted). Parmi ces cellules mésenchymateuses déficientes en HLA-A2 et résistantes à la lyse par les CTLs, il y en a celles qui sont sensibles aux NK (SNAI1 et SNAI1-6SA) et celles qui leur sont résistantes (2101 et shWISP2) (**Figure 30**). La résistance des lignées 2101 et shWISP2 aux NK malgré la sous expression de la molécule HLA-A2 peut être expliquée par le fait qu'elles se caractérisent par une mutation de p53 et par l'activation de la voie TGF- β suite à l'inhibition du suppresseur de tumeurs WISP2/CCN5, respectivement. Cela leur permet probablement d'adopter certains mécanismes d'échappement aux cellules NK.

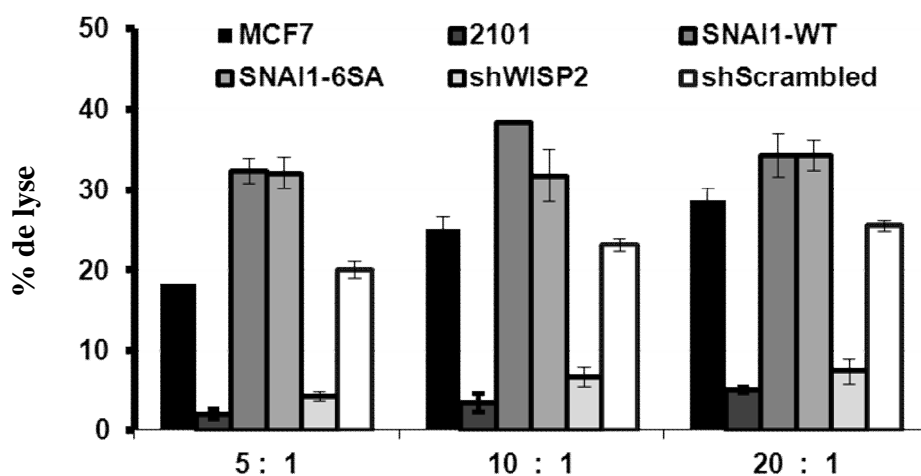


Figure 29: Comparaison de la susceptibilité des cellules épithéliales versus mésenchymateuses à la lyse par les cellules NK.

Dans le cadre de notre étude, la perte de l'expression de la molécule HLA-A2 n'est pas le seul mécanisme adopté par les cellules tumorales mésenchymateuses pour échapper à la lyse par les CTLs. En effet, dans le premier modèle d'étude, j'ai montré que les mécanismes de résistance à la lyse par les CTLs qui accompagnent le déficit au niveau de la reconnaissance des cellules tumorales par le CTL sont liés également à l'induction de l'autophagie et à l'acquisition des propriétés de cellules souches cancéreuses (Akalay et al., 2013a). Le lien entre l'autophagie et l'acquisition d'une résistance à la lyse des cellules tumorales par les CTLs a été également établi dans un contexte

cellulaire d'hypoxie. En effet, au sein de notre laboratoire, il a été montré dans un modèle de cancer de poumons non-à-petites-cellules que l'hypoxie est capable d'induire une résistance à la lyse par les CTLs via l'activation de l'autophagie (Noman et al., 2011). Il a été également établi dans ce même modèle cellulaire de cancer de poumons que la surexpression du marqueur de cellules souches cancéreuses, Nanog, suite à l'hypoxie pourrait induire une résistance des cellules tumorales à la lyse par les CTLs (Hasmim et al., 2011).

Dans le deuxième modèle expérimental, j'ai montré que l'induction de propriétés de cellules souches cancéreuses essentiellement via le facteur de transcription KLF4, et que la régulation négative de l'expression des miRNAs, et plus spécifiquement le miR-7 suite à l'induction de la voie TGF- β représentent également un mécanisme d'induction de la résistance des cellules mésenchymateuses à la lyse par les CTLs (Akalay et al., manuscript submitted).

Dans la littérature, deux études décrivaient un lien entre l'EMT et la résistance à la réponse immunitaire anti-tumorale: La première a proposé un éventuel rôle de l'EMT dans l'induction de l'immunoediting suite à l'induction de variants résistants sous-exprimant les Ags tumoraux dans des souris FVB/N après avoir transplanté des tumeurs provenant de souris transgéniques capables de développer le cancer mammaire (Heu/neu) (Knutson et al., 2006). La deuxième étude a établi, en utilisant des lignées cellulaires de mélanome murines et humaines transfectées avec Snail, que l'EMT est capable d'induire des cellules T régulatrices et des cellules dendritiques inefficaces en partie via la production de la TSP1 tout en échappant à l'immunothérapie (Kudo-Saito et al., 2009). Cette étude est un peu controversée par rapport aux études qui montrent que les cellules tumorales de mélanome ne possèdent pas à la base un phénotype épithélial étant donné qu'elles sont d'origine mélanocytaire caractérisée par un phénotype mésenchymateux-like. Nous l'avons constaté également quand j'ai étudié le rôle de l'EMT dans la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les CTLs dans un modèle de mélanome composé d'une lignée primitive (T1) et de sa correspondante métastatique (G1) du même patient et du clone CTL autologue (LT12). En effet, au cours de cette étude, j'ai montré que la transfection de la lignée primitive du mélanome (T1) avec un plasmide contenant le gène codant pour Snail induit une diminution de la susceptibilité à la lyse de cette lignée cellulaire par le clone LT12 de manière comparable à sa correspondante métastatique (G1) (**Figure 31**). Seulement, en étudiant l'expression des différents marqueurs de l'EMT sur ce couple de lignées de mélanome, nous avons constaté qu'elles se caractérisent par un phénotype hybride qui peut être lié à l'origine mélanocytaire/mésenchymateuse-like des mélanomes; cela ne nous a pas permis de trancher quant au caractère épithélial/mésenchymateux de celles-ci.

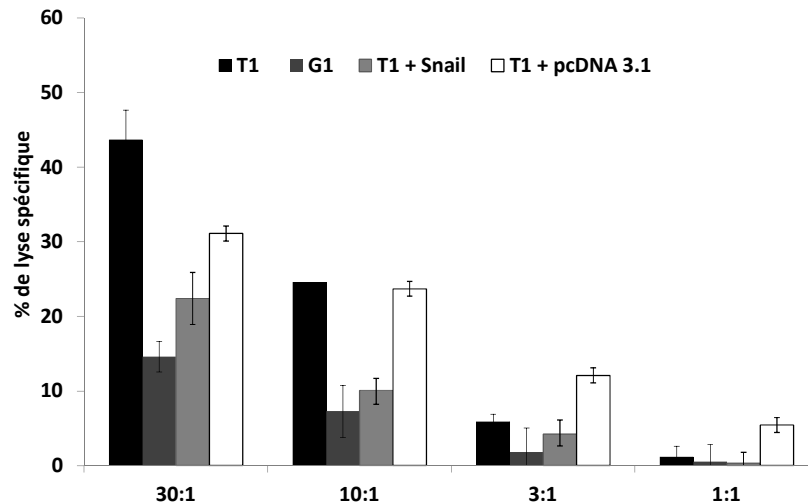


Figure 30: La transfection de la lignée primitive de mélanome T1, sensible à la lyse par les CTLs, avec Snail induit une diminution de sa susceptibilité à la lyse.

En dépit de la découverte du lien entre l'EMT et la résistance à la réponse immunitaire anti-tumorale à la suite des travaux cités auparavant (Knutson et al., 2006; Kudo-Saito et al., 2009), les mécanismes via lesquels l'EMT pourrait induire une résistance des cellules tumorales à la lyse par les CTLs demeuraient méconnus. Dans ce projet de thèse, quelques mécanismes responsables de l'induction de la diminution de la susceptibilité des cellules mésenchymateuses à la lyse par les CTLs sont décryptés:

- Le premier mécanisme est lié à l'induction de l'autophagie en démontrant, dans notre premier modèle d'étude, que les marqueurs mésenchymateux sont capables d'activer certains activateurs de l'autophagie (CDKN2A, DAPK) et d'inhiber un suppresseur de l'autophagie à savoir PTEN (Akalay et al., 2013a). En comparaison d'une part aux études montrant le lien entre l'autophagie et l'acquisition des propriétés de cellules souches cancéreuses dans le cancer du sein (Cufi et al., 2011; Yue et al., 2013), et d'autre part aux autres études montrant le rôle de l'EMT dans l'induction de celles-ci (Mani et al., 2008), mon premier projet de thèse dévoile pour la première fois le lien entre l'EMT et l'autophagie (Akalay et al., 2013a). De plus, une étude très récente a établi que Becline 1 est nécessaire à la tumorigénicité des BCSC (Breast Cancer Stem Cells) (Gong et al., 2013). Cela s'accorde avec nos résultats montrant que l'inhibition de l'autophagie dans les cellules mésenchymateuses/BCSC est capable de restaurer la lyse de ces dernières par les CTLs.
- Les mécanismes de résistance aux CTLs décrits dans notre deuxième modèle expérimental (qui repose sur l'activation de la voie TGF- β suite à l'inhibition du suppresseur de tumeur WISP2/CCN5) figurent dans l'induction de l'expression du facteur de transcription inducteur des propriétés de cellules souches cancéreuses (KLF4) et dans l'inhibition de l'expression du miR-7 (Akalay et al., manuscript submitted). Malgré l'effet montré de l'inhibition de la voie TGF- β sur

l'expression de quatre miRs (le miR-7, le miR-200b, le miR200c et le miR429), le miR-7 est le seul parmi ces quatre miRs à avoir un effet sur la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les CTLs (Akalay et al., manuscript submitted). Ceci s'accorde avec une étude très récente qui rapporte le rôle du miR-7 dans la suppression des métastases cérébrales dues aux BCSC en modulant l'expression de KLF4 (Okuda et al., 2013). De plus, l'inhibition de la voie de signalisation TGF- β en ciblant le récepteur I du TGF- β avec la drogue A83-01 ainsi que l'inhibition de l'expression de KLF4 avec un siRNA restaurent la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les CTLs. La drogue A83-01 est utilisée dans des essais précliniques (Ganapathy et al., 2010; Biswas et al., 2007; Iizumi et al., 2008).

Le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace peut être également inhibé par des facteurs immunosuppresseurs sécrétés dans le microenvironnement par les cellules cancéreuses elles-mêmes, par les effecteurs du système immunitaire et aussi par les autres composants du stroma tumoral (Kiessling et al., 1999) (**Figure 32**). Un ensemble de cytokines ont un effet immunosuppresseur notamment le TGF- β , l'IL10, le VEGF, l'IL6 et le MCSF (**Figure 32**).

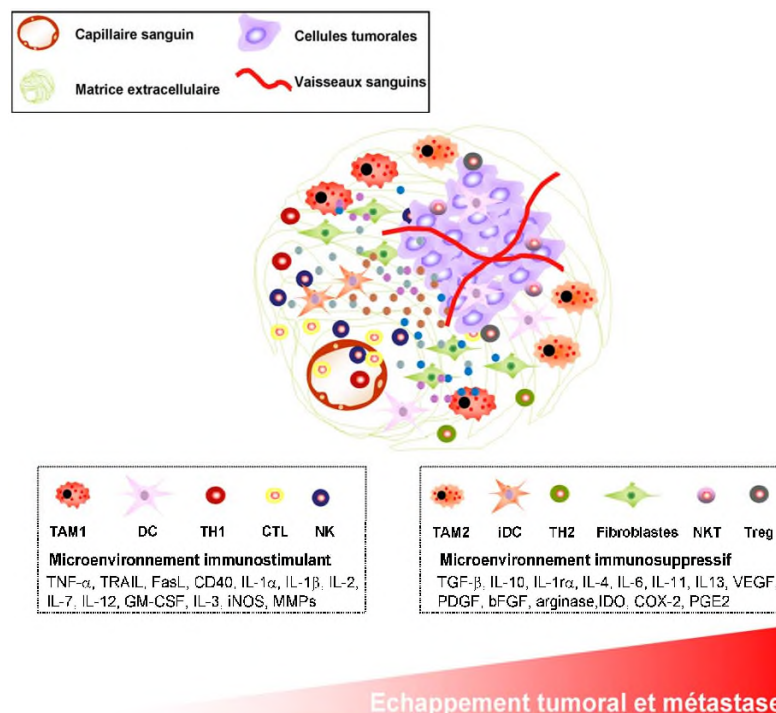


Figure 31: Les éléments du microenvironnement tumoral favorisant l'émergence d'un milieu immunosuppresseur favorable à la croissance des cellules tumorales.

De nombreuses études cliniques ont décrit une corrélation entre la quantité des TAM (Tumor Associated Macrophages) infiltrant la tumeur et un mauvais pronostic des patients. Ainsi, la forte densité des TAM est associée à la progression tumorale et aux métastases. Le phénotype M2 des TAM est favorisé par des facteurs sécrétés par la cellule tumorale (cytokines, prostaglandines)

(Elgert et al., 1998). A leur tour, les TAM produisent des facteurs de croissance, des métalloprotéinases, des facteurs pro-angiogéniques et immunosuppresseurs, qui altèrent les fonctions des lymphocytes T (Pollard, 2004; Sica et al., 2006). De plus, certaines études ont montré le rôle des TAM dans l'induction de l'EMT dans des cellules tumorales murines F9 et celles de la glande mammaire NMuMG (Bonde et al., 2012). Nous nous sommes donc intéressés à l'étude du rôle des TAM dans l'induction de l'EMT dans la lignée épithéliale MCF7. En effet, après traitement de la lignée THP1 par la PMA (Phorbol Myristate Acetate) qui a été décrite capable d'induire un phénotype M2 des macrophages provenant de la lignée monocyttaire THP1 (Tjiu et al., 2009), nous obtenons donc des TAM-M2 que nous cultivons ensuite en transwell avec la lignée MCF7. Nos analyses préliminaires, en western-blot, de l'expression des marqueurs de l'EMT après cette co-culture montrent que celle-ci est capable d'induire l'EMT (**Figure 33**) et l'expression du marqueur de cellules souches cancéreuses OCT4 (**Figure 34**) dans la lignée épithéliale MCF7. Ceci s'accorde avec les études décrivant le lien entre l'acquisition du phénotype M2 par les TAM et l'induction de l'EMT et de propriétés invasives.

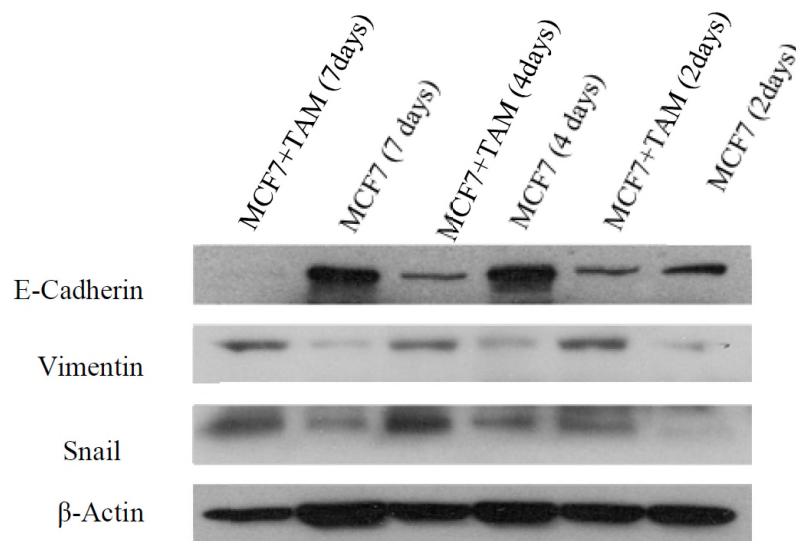


Figure 32: Induction de l'expression des marqueurs de l'EMT dans la lignée épithéliale MCF7 suite à la co-culture avec les TAM dérivés de la lignée monocyttaire THP1

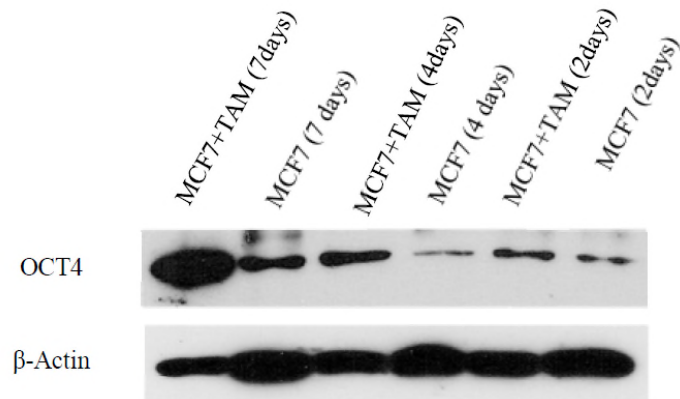


Figure 33: Induction de l'expression du marqueur de cellules souches cancéreuses OCT4 dans la lignée épithéliale MCF7 suite à sa co-culture avec les TAM dérivés de la lignée monocyttaire THP1

Dans leur ensemble, ces données soutiennent une implication de l'EMT dans la régulation de la réponse immunitaire spécifique anti-tumorale et soulignent un intérêt particulier de son ciblage pour améliorer l'efficacité des approches thérapeutiques actuelles.



Conclusions et perspectives

A l'heure actuelle, une perspective prometteuse pour le traitement du cancer serait de développer des stratégies innovatrices en immunothérapie induisant ou optimisant une réponse immune capable de viser et d'évincer spécifiquement les cellules tumorales. En revanche, et en dépit des connaissances actuelles en immunologie anti-tumorale, le développement de traitements efficaces des tumeurs solides basés sur l'immunothérapie n'a pas encore abouti sur des résultats satisfaisants. C'est ainsi que l'amélioration des vaccins existants et la mise au point des stratégies immunothérapeutiques alternatives seraient donc primordiales. De plus, il est aussi essentiel de comprendre les mécanismes induisant l'échappement tumoral au système immunitaire dans un contexte de plasticité tumorale afin d'améliorer ces stratégies thérapeutiques.

Parmi les processus impliqués dans la plasticité tumorale, on distingue l'EMT. Cette dernière a été corrélée à l'acquisition du phénotype invasif, aux métastases et à l'acquisition de propriétés de cellules souches cancéreuses. Toutes ces caractéristiques dotent les tumeurs d'un mauvais pronostic et d'une résistance aux thérapies conventionnelles et à l'immunothérapie. De plus, le but principal de la plupart des stratégies immunothérapeutiques repose sur l'induction d'une réponse efficace des lymphocytes T cytotoxiques. De ce fait, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle de l'EMT dans la réponse des cellules tumorales à la lyse par les effecteurs spécifiques du système immunitaire, les CTLs.

A la lumière de nos résultats, il apparaît que l'EMT est capable d'induire une diminution de la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les CTLs en partie via la diminution de l'expression de la molécule HLA-A2 à la surface des cellules tumorales (Akalay et al., 2013a; Akalay et al., manuscript submitted). De plus, dans le modèle WISP2, nous montrons dans la cellule mésenchymateuse shWISP2, comparée à ses correspondantes épithéliales, une diminution de l'expression des TAP1 et TAP2 (Transporter associated with Antigen Processing) permettant le transport des peptides tumoraux dans le réticulum endoplasmique (Akalay et al., manuscript submitted). Ces résultats s'accordent avec une étude montrant la régulation négative de la molécule HLA classe I et de TAP1 et TAP2 dans des cancers du sein de haut grade (Vitale et al., 1998). En outre, l'analyse des profils génomiques des lignées constituant le premier modèle expérimental de notre étude, montre une diminution de l'expression de la chaperonne tapasine impliquée dans le chargement des peptides tumoraux sur la molécule HLA-A2 dans les lignées mésenchymateuses SNAI1, SNAI1-6SA et 2101 en comparaison avec leur correspondante épithéliale MCF7 (**Tableau 4**). Ce résultat a été confirmé par qRT-PCR (**Figure 35**). Cela suggère un rôle de l'EMT dans la régulation du processus de l'apprêtement des antigènes. De plus, au niveau de la synapse immunologique formée entre ces lignées et le CTL, j'ai observé une différence au niveau du contact

établi entre la cellule épithéliale et le CTL d'un côté et entre la cellule mésenchymateuse et ce CTL de l'autre côté (Akalay et al., 2013a). Ce résultat suggère alors des altérations au niveau de la signalisation à la synapse immunologique liée à l'expression des facteurs de transcription induisant l'EMT dans la cellule tumorale. Ainsi, la dissection du dialogue entre ces cellules tumorales et le CTL doit être davantage élargie pour pouvoir élucider, plus profondément, les mécanismes moléculaires altérant la réactivité lymphocytaire suite à l'induction de l'EMT.

Tableau 4: La régulation négative de l'expression de la chaperonne Tapasine suite à l'induction de l'EMT

(D'après une analyse génomique sur puces Agilent).

Lignées cellulaires	MCF7 vs 2101	MCF7 vs SNAI1 WT	MCF7 vs SNAI1 6SA
Fold change (TAP binding protein-like (Tapasin))	5,4031	6,93073	5,16478

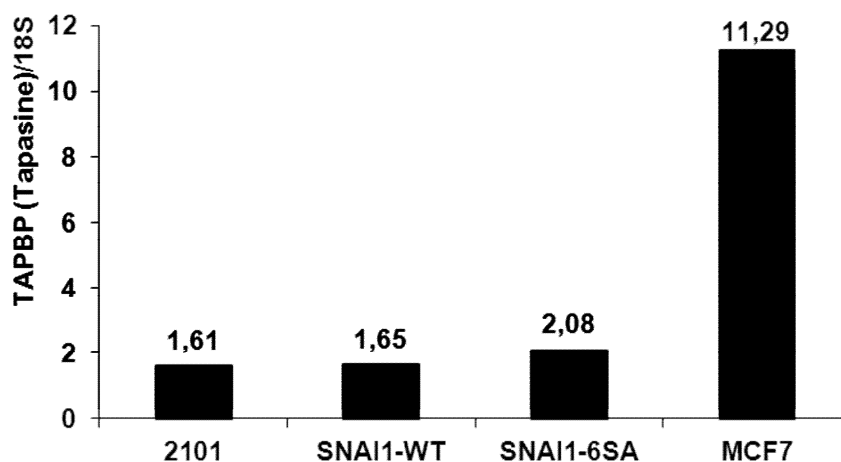


Figure 34: Validation par qRT-PCR de la régulation négative de l'expression de la chaperonne Tapasine suite à l'induction de l'EMT.

Ces constats suggèrent un rôle de l'EMT dans l'induction d'un déficit au niveau du *processing*. Cette piste serait intéressante à poursuivre afin de disséquer le rôle de la régulation négative observée concernant les protéines impliquées dans l'apprêtement des antigènes tumoraux dans la résistance des cellules tumorales à la lyse par les CTLs suite à l'induction de l'EMT.

Dans la première partie de mon projet de thèse montrant l'induction de la diminution de la susceptibilité des cellules mésenchymateuses à la lyse par les CTLs via l'induction de l'autophagie,

nous avons établi un lien entre certains marqueurs de l'EMT et certains régulateurs de l'autophagie, en démontrant que certains marqueurs mésenchymateux régulent positivement certains régulateurs de l'autophagie et négativement le suppresseur de l'autophagie PTEN (Akalay et al., 2013a; Akalay et al., 2013b). Ainsi, il serait intéressant de rechercher la voie via laquelle l'EMT régule l'autophagie et laquelle a un effet direct sur la lyse spécifique. Cela peut être réalisé d'abord en inhibant/induisant les régulateurs de l'autophagie contrôlés par l'EMT que nous avons identifiés, et ensuite en contrôlant leur effet sur la lyse par les CTLs. Cette éventuelle voie pourrait probablement être ciblée dans le cadre de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans le cadre de mon deuxième projet sur le modèle cellulaire WISP2, nous avons établi que l'induction de la voie de signalisation TGF- β , inductrice de l'EMT, suite à l'inactivation du gène WISP2 induit une résistance à la lyse des cellules tumorales par les CTLs via l'induction de l'expression de KLF4 et via l'inhibition de l'expression du miR-7. De manière intéressante, certaines études ont montré l'effet de la drogue A83-01 ciblant le récepteur I du TGF- β (ALK5) dans l'inhibition de la voie de signalisation TGF- β et dans la réversion du phénotype mésenchymateux (Tojo et al., 2005; Calone and Souchelnytskyi, 2012; Iizumi et al., 2008). Dans le cadre de mon projet, j'ai montré que le traitement de la lignée cellulaire shWISP2 avec cette drogue est capable de reverser partiellement son phénotype mésenchymateux et de restaurer sa lyse par les CTLs (Akalay et al., manuscript submitted). En outre, les analyses des profils génomiques et de l'expression des miRNAs ont dévoilé que cette drogue est capable de restaurer l'expression du miR-7 et de KLF4 impliqués dans la résistance à la lyse spécifique (Akalay et al., manuscript submitted). Cette étude prouve également le rôle de KLF4 dans l'induction des propriétés de cellules souches cancéreuses caractérisées par leur capacité d'autorenouveau. Il serait ainsi intéressant premièrement de valider ces observations *in-vivo* en comparant la capacité des cellules WISP2 à générer des tumeurs avec celle des souris traitées avec la drogue A83-01, et également de reproduire nos expériences d'immunohistochimie effectuées sur les coupes de patientes sur les tumeurs provenant de ces souris traitées et non-traitées avec cette drogue afin d'étudier l'expression des marqueurs de l'EMT, de la voie de signalisation TGF- β et de KLF4 (Akalay et al., manuscript submitted).

Certains éléments du microenvironnement tumoral jouent un rôle immunosuppresseur y compris les TAMs (Tumor Associated Macrophages). De plus, certains travaux montrent le rôle des TAMs, essentiellement les macrophages de phénotype M2 dans l'induction de l'EMT. Comprendre les mécanismes via lesquels ces macrophages induisent une immunosuppression est d'un grand intérêt. De ce fait, nous avons commencé à étudier leur rôle dans l'induction de l'EMT dans notre lignée épithéliale MCF7. Il apparaît qu'elles sont capables d'induire l'EMT dans cette lignée après leur co-

culture (résultat illustré dans la partie « discussion générale » de ce manuscrit). Il serait ainsi pertinent de rechercher d'abord les facteurs induisant l'EMT par les M2 en analysant l'expression des différentes cytokines capables d'induire l'EMT dans le surnageant de co-culture (ex : TGF- β , IL-6,...). Ensuite, on pourrait étudier l'impact de cette co-culture sur la lyse par les CTLs. Cela permettrait d'une part d'étudier le rôle d'une nouvelle forme d'induction de l'EMT dans l'acquisition de la résistance des cellules tumorales à la lyse par les CTLs, et d'autre part de mieux comprendre les mécanismes via lesquels les macrophages M2 induisent l'immunosuppression.

L'hypoxie a été montrée capable d'induire des métastases via l'induction de l'EMT, essentiellement en induisant l'expression du facteur de transcription inducteur de l'EMT, Twist (Yang et al., 2008). D'après mes résultats préliminaires, la mise de la lignée épithéliale MCF7 sous des conditions d'hypoxie est capable d'induire uniquement une légère expression de Slug et uniquement à 72 heure sur toute la cinétique sous 0,1% de O₂. De plus, l'analyse des profils génomiques de la lignée MCF7 en normoxie *versus* hypoxie (8, 16 et 24 heures) montre une régulation de certains gènes liés à l'EMT par l'hypoxie (ex: GSK, la fibronectine, les claudines,..) (**Tableau 5**). Il est ainsi nécessaire d'utiliser la méthode de la mesure du score de l'EMT capable d'analyser l'ensemble des gènes associés à la régulation de l'EMT (Akalay et al., 2013a; Akalay et al., manuscript submitted) afin de confirmer l'impact de l'hypoxie sur l'induction de l'EMT dans la lignée cellulaire MCF7. Dans le cas où l'EMT sera induite, il sera nécessaire d'examiner l'effet de cette induction sur la lyse spécifique. La continuité de cet axe va nous permettre d'élucider l'influence du microenvironnement hypoxique dans la régulation de la susceptibilité à la lyse spécifique via l'induction de l'EMT.

Tableau 5: Impact de l'hypoxie sur la régulation des gènes liés à l'EMT dans la lignée cellulaire MCF7.

Hypoxia vs Normoxia		Fold change		
GeneName	Description	8h	16h	24h
BMP7	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1) mRNA	-3,0		
CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa mRNA	1,5		1,6
CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1, mRNA	2,7	4,4	5,2
CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa mRNA			3,3
CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa, mRNA			3,3
CTNNA2	catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein)			-2,0
CDC42SE2	CDC42 small effector 2 transcript variant 1, mRNA	2,2	1,0	1,9
CLIC4	chloride intracellular channel 4 mRNA	2,1	0,5	0,4
CLDN11	claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein) (CLDN11), mRNA	-1,6		-2,2
CLDN4	claudin 4 mRNA	-3,8		
CLDN7	claudin 7 mRNA	-2,2		-1,6
DSP	desmoplakin transcript variant 1, mRNA	2,0	2,9	3,3
EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian) transcript variant 1, mRNA	9,0	18,3	9,9
EPB41L5	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5 mRNA	2,3	2,1	2,7
FN1	fibronectin 1 transcript variant 1, mRNA	1,5		
GPI	glucose phosphate isomerase mRNA		5,1	3,4
GSC	goosecoid mRNA	-3,0	-2,5	-2,5
IRS1	insulin receptor substrate 1 mRNA			
ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1), transcript variant 1A, mRNA	2,1	1,8	2,6
LAMA5	laminin, alpha 5 mRNA	-3,4		-1,5
LAMB2	laminin, beta 2 (laminin 5) mRNA	-1,7		
LAMB3	laminin, beta 3 transcript variant 2, mRNA		2,3	
SMAD3	mad protein homolog (hMAD-3) mRNA, complete cds.			-2,1
MESP1	mesoderm posterior 1 homolog (mouse) mRNA	-2,7	-2,2	-3,1
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 transcript variant 1, mRNA	-2,3	-2,0	-1,9
NFYB	nuclear transcription factor Y, beta mRNA		1,9	2,2
OCLN	occludin mRNA	2,1	2,9	3,1
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor transcript variant 3, mRNA	2,3	4,4	2,0
SP1	Sp1 transcription factor mRNA	-2,6		-1,7
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal) mRNA	2,2	4,8	3,3
TAZ	tafazzin (cardiomyopathy, dilated 3A (X-linked); endocardial fibroelastosis 2; Barth syndrome) transcript variant 1, mRNA	-2,8	-2,4	-1,8

L'efficacité des thérapies basées sur le TAL (Transfert Adoptif de Lymphocytes) est limitée par les mécanismes d'échappement tumoral à la réponse immunitaire. L'EMT pourrait être l'un de ces mécanismes limitant la réussite du TAL. Afin de confirmer cela, il serait intéressant de comparer *in-vivo* la croissance tumorale des cellules épithéliales *versus* les cellules mésenchymateuses constituant nos deux modèles d'étude tout en injectant le clone CTL Heu33.

L'ensemble de nos résultats révèle le rôle de l'EMT dans la régulation de la réactivité lymphocytaire et la lyse spécifique en utilisant différents mécanismes. Il est ainsi nécessaire d'inclure l'immunothérapie dans un processus intégratif prenant en compte la réponse immune anti-tumorale d'une part et la plasticité tumorale d'autre part afin d'améliorer l'efficacité des traitements. Une meilleure connaissance des liens existant entre les différents processus impliqués dans l'émergence de variants résistants au système immunitaire et dans la plasticité cellulaire et de leur impact sur le dialogue entre les CTLs et la cellule tumorale dans un contexte du microenvironnement tumoral permettrait d'assurer une immunothérapie plus efficace.



Annexe I



REVIEW ARTICLE

Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune?

A. Hamai¹, H. Benlalam¹, F. Meslin¹, M. Hasmim¹, T. Carré¹, I. Akalay¹, B. Janji², G. Berchem², M. Z. Noman¹ & S. Chouaib¹

¹ INSERM, U753, Laboratoire d'Immunologie des Tumeurs Humaines: Interaction Effecteurs Cytotoxiques-Système Tumoral, Institut Gustave-Roussy PR1 and IFR 54, Villejuif, France

² Laboratory of Experimental Hemato-Oncology, Public Research Center For Health (CRP-Sante), Luxembourg City, Luxembourg

Key words

cytoskeleton; endothelial cells; metastasis; p53; specific lysis; tumor hypoxia; tumor resistance; EMT

Correspondence

Salem Chouaib
INSERM, U753
Laboratoire d'Immunologie des Tumeurs Humaines: Interaction Effecteurs Cytotoxiques-Système Tumoral
Institut Gustave-Roussy PR1 and IFR 54
94805 Villejuif
France
Tel: +33 1 4211 4575
Fax: +33 1 4211 5288
e-mail: chouaib@igr.fr

doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01401.x

Abstract

Accumulating evidence indicates that the innate and adaptive immune systems participate in the recognition and destruction of cancer cells by a process known as cancer immunosurveillance. Tumor antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL) are the major effectors in the immune response against tumor cells. The identification of tumor-associated antigen (TAA) recognized primarily by CD8⁺ T-lymphocytes has led to the development of several vaccination strategies that induce or potentiate specific immune responses. However, large established tumors, which are associated with the acquisition of tumor resistance to specific lysis, are usually not fully controlled by the immune system. Recently, it has become clear that the immune system not only protects the host against tumor development but also sculpts the immunogenic phenotype of a developing tumor and can favor the emergence of resistant tumor cell variants. Moreover, it has become obvious that the evasion of immunosurveillance by tumor cells is under the control of the tumor microenvironment complexity and plasticity. In this review, we will focus on some new mechanisms associated with the acquisition of tumor resistance to specific lysis during tumor progression, involving genetic instability, structural changes in cytoskeleton, and hypoxic stress. We will also discuss the interaction between CTLs and tumor endothelial cells, a major component of tumor stroma.

Introduction

CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) are important effector cells during tumor rejection and have been described to play a crucial role in host defense against malignancies in both mouse and human (1). However, accumulating evidence indicates that tumor cells play a crucial role in the control of immune protection (2) and contain many overlapping mechanisms to maintain their functional disorder and evasion. In this regard, it has been suggested that *in vivo* tumor cell growth is not only influenced by CTL–tumor cell recognition but also by the tumor susceptibility to cell-mediated death.

Research over the past decade in tumor immunology has validated the concept of cancer immune surveillance which predicts that the immune system can recognize precursors of cancer and, in most cases, destroy these precursors before they become clinically apparent. Identification of tumor-associated antigen (TAA) has been critically important and

has allowed advances in the field of cancer vaccine. In this regard, most of immunotherapeutic strategies are essentially focusing on the induction of cytolytic effector cells such as specific CTLs. Although some vaccines can efficiently generate a CTL response in patients, there has been a lack of correlation between immune and clinical response in the patients treated (3). In fact, despite the expression of TAA, tumor eradication by the immune system is often inefficient. This is mainly because of the ability of tumor cells to escape the immune system by developing resistance to immune attacks (2). It is well known that in addition to changing their antigenic profile to make themselves elusive targets, genomic instability provides the tumor with plasticity manifested as resistance to apoptosis, cellular survival, or proliferation through a variety of strategies. In addition, the emergence of different malignant phenotypes appears to be correlated with selective pressure exerted by the host immune system (4).

Several studies support the notion that tumor development relies on a continuous cross-talk between cancer cells and their cellular and extracellular microenvironments. This signaling cross-talk is mediated by transmembrane receptors expressed on cancer cells and stromal cells. Increasing evidence also shows that the interaction between neoplastic cells and the surrounding stroma is a critical factor in solid tumor growth. The tumor stroma is made up of diverse cellular populations including macrophages, lymphocytes, vascular cells, and carcinoma-associated fibroblasts. Tumor cell microenvironment also has a major role in cancer where it promotes tissue remodeling, neoangiogenesis, and manipulates immune cells through secretion of several factors (e.g. chemokines, cytokines, etc.) (5). Thus, the immune system escape mechanisms were classified into several categories according to their intrinsic or extrinsic features (summarized in Figure 1). These affect tumor cells and/or the host immune system, and play an important role in the selection of specific tumor escape variants. The tumor–host interactions, in which the immune system exerts both host-protecting and tumor-sculpting effects, are complex and dynamic and deserve more investigation.

In this review, we will focus on some aspects of the molecular basis of tumor resistance to CTL-induced killing, in particular the involvement of p53, the structural changes of the cytoskeleton, the influence of hypoxia, and finally, CTL-induced endothelial cells lysis.

p53: a potential regulator of granzyme B-induced cell death

Tumor cells are characterized by extreme genetic instability, which allows loss of various tumors markers and emergence of resistant variants. The most commonly mutated gene in human cancer is p53 which is the prototype of genetic instability. Fifty percentage of all human cancers lose p53 function by mutation which correlates with metastasis and poor prognosis. Cancers with inactive mutant p53 are aggressive and are often resistant to radiation and chemotherapy.

We have previously shown that p53 is a key determinant in anti-tumor CTL response as it regulates induction of Fas receptor expression, cellular FLICE/caspase-8 inhibitory protein (cFLIP) short protein degradation, and CD95-induced activation of the mitochondrial cell death pathway in tumor cells (6, 7). We also investigated the relationship between p53 and granzyme B (GrB) during tumor-specific lysis and showed that CTL–tumor target cell interaction resulted in p53 accumulation and activation in target cells (8). Such activation is mediated by GrB and contributes, at least in part, to GrB-induced apoptosis. Cytotoxic assays using recombinant GrB showed that this serine protease is the predominant factor inducing such accumulation. Therefore, in addition to its role in controlling irradiation and drug responses, p53 appears to play a key role in the regulation of CTL-mediated apoptosis of tumor cells. These findings provide new insight into a potential

role for p53 as a component involved in the dynamic regulation of the major pathway of CTL-mediated cytotoxicity.

Cytoskeleton disorganization as a new mechanism conferring target resistance to CTLs

The cytoskeleton is one of the main modulators of cell–cell and cell–matrix interactions. It acts as a scaffold able to reorganize and relocate the various molecules implicated in these interactions. Moreover, it plays a deeper role because it is crucial for several signaling pathways. Although the role of the cytoskeleton is relatively well described in the immune effector cells, little is known about its putative involvement in the control of target cell behavior during a cytotoxic response. Recently, from a CTL-sensitive tumor cell line, we have established resistant variants after specific CTL selection pressure and noticed that such resistant variant displayed a strong morphological change with alterations of the actin cytoskeleton. Transcriptional profiling identified a gene expression signature that distinguished sensitive from resistant tumor targets. More notably, we found that actin-related genes *ephrin-A1* and *scinderin* were overexpressed in resistant targets. Silencing of these genes using RNA interference resulted in the restoration of normal cell morphology and a significant attenuation of variant resistance to CTL killing. We provided evidence that a shift in cytoskeletal organization can be used by tumor cells, as a strategy to promote their resistance after CTL selection pressure (8). In this regard, the cytoskeleton can no longer be considered only as a structural framework playing a role in cell shape adhesion, motility, exocytosis, and endocytosis. Further, when these resistant cells were incubated in the presence of the GTPase activating bacterial protein toxin (CNF1), a striking change in the cell morphology including actin polymerization, focal adhesion, and membrane extensions was observed. More importantly, such incubation also resulted in an increased susceptibility (twofold) to CTL-induced cell death. Transcriptional profiling of CNF1-treated resistant cells suggests the involvement of FAK signaling pathway that was found to be constitutively defective in sensitive cells (9). These results suggest that FAK activation plays a key role in the control of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. Therefore, the various strategies aimed for the induction of anti-tumor cytotoxic response should consider cytoskeletal disorganization as a mechanism of tumor escape to CTL-induced cytotoxicity, despite tumor immunogenicity.

Tumor progression and resistance to cell death

Metastasis is considered to be one of the major challenges encountered by oncologists and immunologists. Metastatic cells were previously found to be more resistant to apoptosis induced by cytotoxic treatment (10–13). In fact, metastatic tumors use various immune-escape mechanisms, including loss or down-regulation of human leukocyte antigen (HLA) class I molecules and antigen expression. Despite the

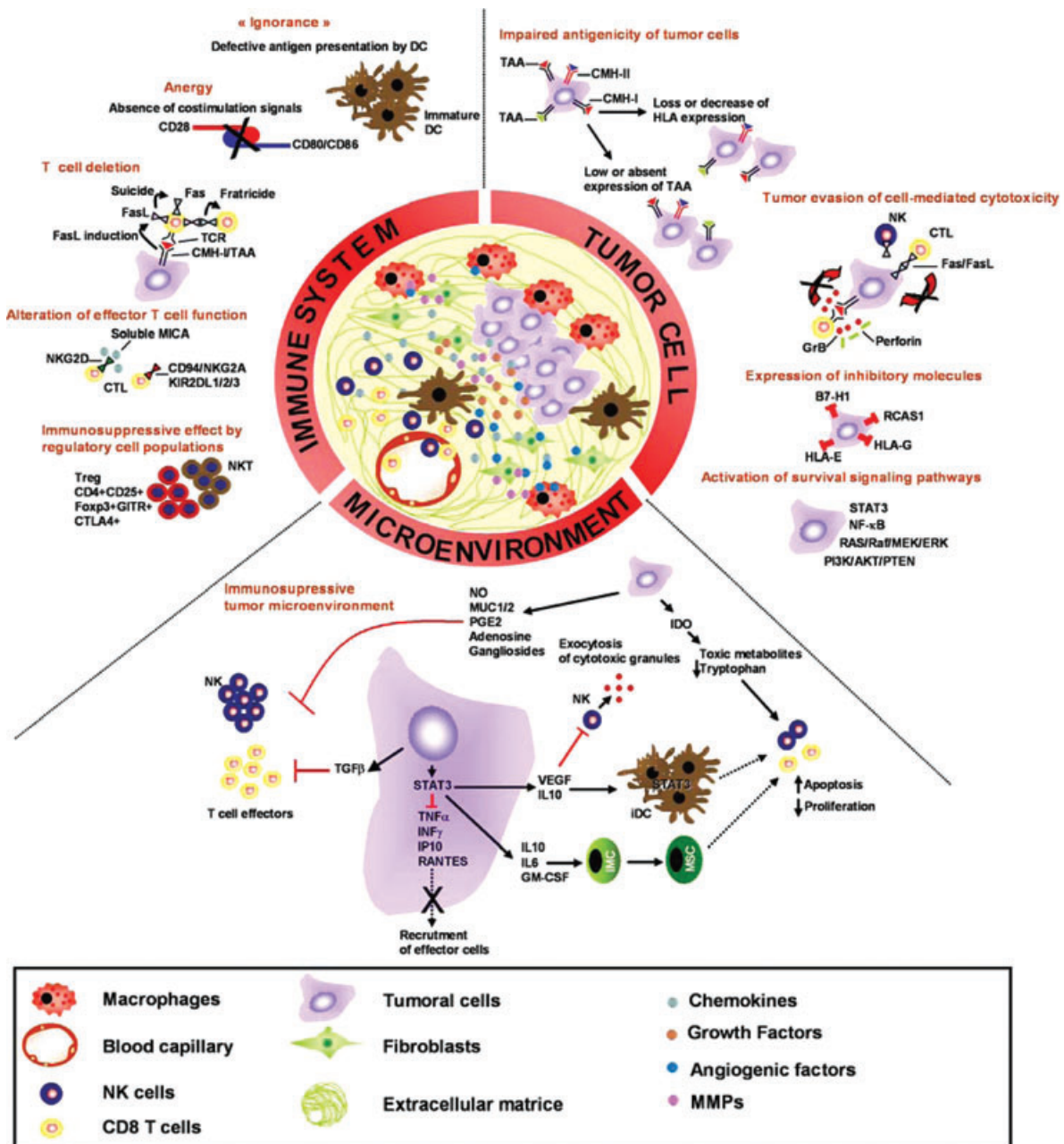


Figure 1 Mechanisms of tumor escape from specific cell-mediated cytotoxicity. *Intrinsic mechanisms from tumor cells:* Alterations in the antigen processing or/and presentation by tumor cells, acquisition of tumor resistance to apoptosis, expression of inhibitory molecules, and activation of survival signaling pathways allow them to elude immune effector cell-mediated lysis. *Tumoral microenvironment:* Tumor cells are characterized by the ability to modulate inflammatory responses and to adapt to microenvironment in which tumor cells evolve and edit to promote their growth. *Mechanisms associated to immune system or tolerance:* Several process facilitate tumor evasion from immune response including (1) peripheral tolerance resulting in antigen presentation by immature DC, in the absence of 'danger' signals. (2) Lymphocyte anergy induced in the absence of costimulatory signals. (3) Deletion of effector lymphocytes. In fact, surface expression of FasL on T-cells is induced by lymphocyte activation after specific recognition, via T-cell receptor (TCR) of the appropriate antigen and HLA class I molecule presented by tumor target. Activated lymphocytes are able to kill themselves ('suicide') or kill Fas-expressing lymphocytes nearby ('fratricide'). (4) Alteration of effector T-cell function by HLA class-I-specific inhibitory receptor expression (CD94/NKG2A or KIR2DL1/2/3) or subversion of effector cell function as for example by shedding NKG2D ligands (MICA), which in membrane form act as T-cell and NK-cell activators but are inhibitory in the soluble form. (5) Inhibition of T-cell effector activation by immunosuppressive immune populations: Treg by direct contact with lymphocytes or by the inhibition of antigen-presenting cell (APC); natural killer T (NKT) by interleukin 13 (IL-13) immunosuppressive cytokine production.

expression of TAA, tumor eradication by the immune system is often inefficient (2). In fact, metastatic tumoral resistance involves multiple factors against apoptosis mediated by cytotoxic inducers (TRAIL, FasL, TNF, and CTL) (14). We have recently shown the existence of a differential susceptibility to CTL- and GrB-mediated lysis in metastatic and primitive melanoma cells (15). In this respect, we identified a new tumor immune-escape mechanism involving ICAM-1 expression, independent of its adhesion function in immunological synapse formation. The importance of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1 and CD54), ligand of lymphocyte-function-associated antigen-1 (LFA-1), in interaction between CTL and target cells and CTL-mediated cytotoxicity has been shown in a variety of studies (16, 17). It has been reported that the engagement of LFA-1 on CTL by ICAM-1 on target cells is essential for activation of T-cells and for directing released cytolytic granules into the tumor cells (18–20). ICAM-1 may be in fact associated with other cell molecules, including HLA-I proteins (21). In addition, ICAM-1 overexpression in tumor cells caused a reduced tumor growth rate *in vivo*, correlating with increased lysis by tumor-infiltrating lymphocytes (22–24).

More interestingly, ICAM-1 might function as a cell-surface receptor, capable of initiating intracellular signaling. Furthermore, several studies showed that ICAM-1 expression correlated with melanoma thickness, and suggested that it may contribute to metastatic potential of melanoma cells (25, 26). However, the contribution of this cell adhesion molecule in the progression and metastasis of melanoma remain unresolved. Nevertheless, we obtained data indicating that down-regulation of ICAM-1 expression was sufficient to render metastatic cells resistant to CTLs. This down-regulation of ICAM-1 is correlated to a decreased PTEN activity and subsequent activation of PI-3K/Akt pathway. This strongly suggests that PI3K/AKT pathway also plays an important role in the control of tumor susceptibility of CTL-mediated tumor cell killing.

Epithelial – mesenchymal transition and CTL resistance

One of the key initial events required for metastasis is the cancer cell detachment from the primary site. When epithelial cells lose their characteristics and gain mesenchymal properties during embryogenesis, they undergo the epithelial – mesenchymal transition (EMT), which is associated with the process of metastasis (Figure 2) (27).

Several studies have shown that adenocarcinoma is accompanied by the release of single cells through EMT and that the loss of E-cadherin is one of the important elements that characterize EMT of carcinoma cells. Transcriptional repressors such as Snail and Slug are activated by the loss of E-cadherin. Interestingly, in melanoma, breast cancer and prostate cancer, the expression of mesenchymal markers, such as N-cadherin,

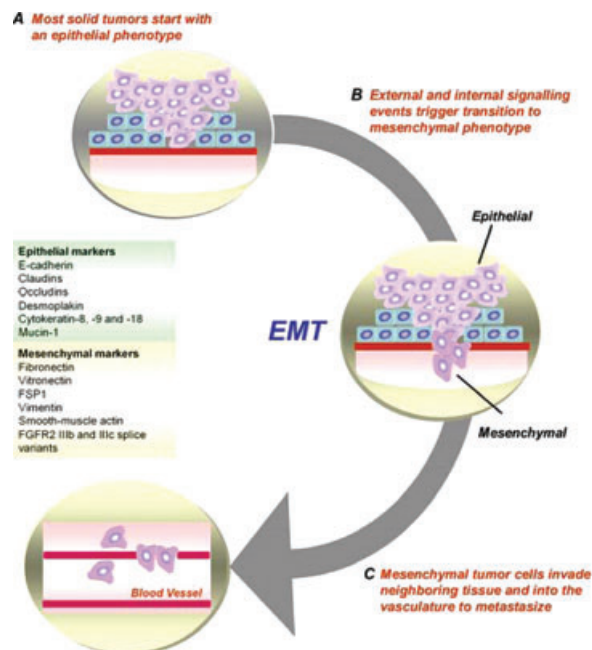


Figure 2 Epithelial – mesenchymal transition (EMT). Invasion and metastasis of epithelial cancers uses transition to a mesenchymal state. A number of markers have been identified that are characteristic of either epithelial or mesenchymal cells and these markers are listed. E-cadherin, epithelial cadherin; ECM, extracellular matrix; FGFR2, fibroblast-growth-factor receptor-2; FSP1, fibroblast-specific protein-1.

led to the loss of E-cadherin. Furthermore, the up-regulation of N-cadherin expression promotes migration of cancer cells. Another transcription factor that activates N-cadherin expression is Twist which is known to trigger EMT, and is a highly conserved basic helix-loop-helix protein involved in metastasis (28).

It should be noted that cancer EMT is regulated by the surrounding stroma via the activation of some signaling pathways such as transforming growth factor- β (TGF- β), endothelial growth factor (EGF), and platelet-derived growth factor (PDGF). Typically, the binding of TGF- β with serine threonine kinase receptors TGF- β R1/TGF- β R2 triggers the phosphorylation of the Smad2/Smad3 dimers that dissociate from the receptors to interact with Smad4 before entering the nucleus to regulate transcriptional modulation of EMT. In this regard, it has been shown that the transcription factor Snail is required for TGF- β -induced EMT by activating PI3K/AKT pathway (Figure 3) (29).

Very recently, a study on the relationship between cancer cells and host immunity during EMT has been reported by Kudo-Saito *et al* (30). The results of this study show that Snail accelerates metastasis not only by enhancing invasion but also by inducing multiple immunosuppression mechanisms. In fact, regulatory T-cells and dendritic cells are induced after Snail transfection in murine and human melanoma cells partly through TSP1 production. Blocking cancer invasion and

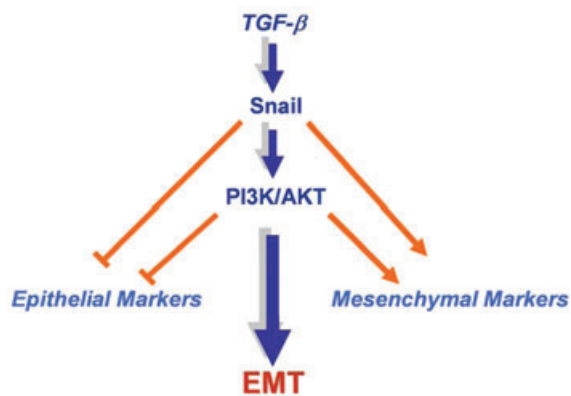


Figure 3 A schematic representation of the proposed transforming growth factor- β signaling mechanism that promotes epithelial–mesenchymal transition via Snail and PI3K/AKT pathway.

immunosuppression can be realized by inhibition of EMT. This suggests a strategy of novel therapeutic targets for the inhibition of metastasis. It will be therefore of major interest to elucidate the impact of EMT on the development and regulation of cell-mediated cytotoxicity.

Hypoxia, hypoxia-inducible factor, and tumor cell susceptibility to CTL-mediated lysis

It is now well established that there are poorly vascularized zones inside solid tumors, which are mainly characterized by severe hypoxia (oxygen deprivation), low pH, and nutrient starvation (31). Hypoxia plays a major role in cancer progression through the activation of major pathways that lead to increased invasive and metastatic potential, as well as resistance to radiation and chemotherapy (32–35). Because hypoxia is a common feature of solid tumors and one of the hallmarks of tumor microenvironment, we asked whether hypoxia confers tumor resistance to CTL-mediated killing.

Indeed, exposure of target tumor cells to hypoxia efficiently inhibited autologous CTL-dependent cell lysis. We further showed that hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) induction and STAT3 activation were responsible for mediating hypoxic inhibition. We show that hypoxia is directly implicated in the acquisition of tumor cell resistance to CTL-mediated lysis via HIF-1 α induction and STAT3 activation. Furthermore, a small novel STAT3 inhibitor has been reported to reverse immune tolerance in malignant glioma patients (36). More recently, Sunitinib was shown to positively change the immunosuppressive phenotype in RCC tumors (37). Interestingly, Junko Ozao-Choy have shown that sunitinib malate, a receptor tyrosine kinase inhibitor, could reverse MDSC-mediated immune suppression and modulate the tumor microenvironment by increasing higher percentage and infiltration of CD8 and CD4 cells, thereby improving the efficacy of immune-based therapies (38).

More interestingly, we have shown that vascular endothelial growth factor (VEGF) neutralization resulted in the

attenuation of hypoxic tumor target resistance to CTL-mediated killing. We have also showed that STAT3 phosphorylation can be stimulated by autocrine signaling through VEGF, suggesting that tumor microenvironment through hypoxia-induced VEGF may play a key role in the induction of active form of STAT3. In this regard, it is very likely that STAT3 activation is associated with the regulation of target gene expression potentially involved in the alteration of hypoxic tumor target-specific killing. Therefore, understanding how VEGF and other soluble factors may lead to STAT3 activation via the tumor microenvironment may provide a more effective cancer treatment strategy for hypoxic tumors with elevated p-STAT3 levels. This also suggests that reduction of VEGF release, a main immunosuppressive factor, in tumor microenvironment may favor the induction of a stronger anti-tumor CTL response against tumors expressing VEGFR.

The proposed role for STAT3 suggests that the effect of hypoxic induction of STAT3 extends beyond its critically important role in controlling cell survival and apoptosis. This emphasizes that a better understanding of the tumor behavior and its interplay with the killer cells in the context of the complexity and plasticity of a hypoxic microenvironment will be a critical determinant in a rational approach to tumor immunotherapy. Although resistance of tumor targets to killer cells is likely to be regulated by multiple factors (39), the hypoxic microenvironment remains an important determinant involved in the control of target sensitivity to CTL-mediated lysis.

Hypoxia has been described as a positive regulator of autophagy through the induction of HIF-1 α . HIF-1 α induces BNIP3 and BNIP3L thereby activating autophagic cell survival by disrupting the autophagy inhibitory complex Beclin-1/Bcl-2 (31, 40–42). More recently, Wilkinson *et al.* (42) showed that the autocrine PDGFR signaling pathway is involved in hypoxia-induced autophagy through a non-canonical mechanism. Preliminary results from our laboratory suggest that hypoxia-induced autophagy is used by the hypoxic tumor cells to protect against cell-mediated cytotoxicity (unpublished data).

Therefore, the possibility that novel approaches targeting HIF-1 α and STAT3 with potent small molecule drugs, being actively developed, may provide an exciting novel approach for cancer immunotherapy.

Functional interaction between CTLs and endothelial cells

The stroma is essential for the tumoral growth and its propagation by providing growth factors and nutrition. Crosstalk between the immune system of the host and the tumoral stroma may occur through direct cell-to-cell contacts and/or soluble factors influencing the functional status of the immune system. Even though tumor cells are the privileged targets of CTLs, recent results in murine models indicate that CTLs are also able to recognize other

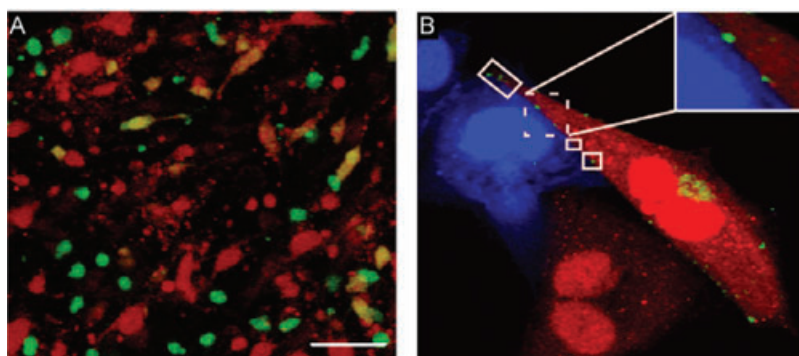


Figure 4 Melanoma-derived stroma cells interactions as monitored by live confocal analysis in three-dimensional (3D) model. (A) Cellular interactions in 3D construct. Confocal microscopy analysis of 3D collagen matrix containing a mix of the tumor cells (red), endothelial cells (yellow), and CD8 T-cell clone (green) after 1800 h of co-culture. Bars: 50 μ m. (B) Gap-junction formation. Cx43 staining after 18 h of endothelial cells (red) and tumor cells (blue) co-culture showed Cx43 based-gap-junction plaques (green, indicated by squares) between the two cell types. A zoom-in is shown. Bars: 10 μ m.

stroma cells including macrophages and fibroblasts. In this regard, it was reported that mouse endothelial cells, which constitute a major component of tumor stroma, can cross-present *in vivo* antigenic peptide to T-cells in non-tumoral

experimental models resulting in T-cell activation or induction of tolerance (43–45). Recently, using a three-dimensional (3D) reconstruct, we analyzed the interactions between three components of tumor stroma derived from melanoma biopsy

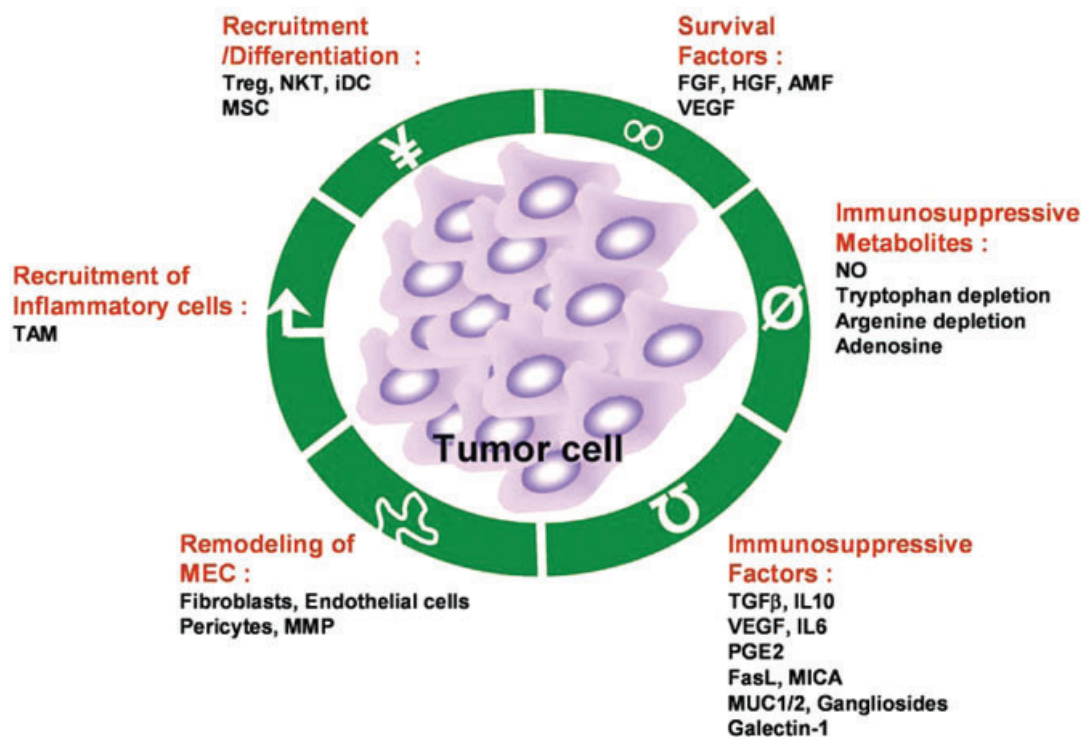


Figure 5 Tumor cells orchestrating the immunosuppressive network of the tumor microenvironment. Tumor cells use a plethora of molecular and cellular immunosuppressive components, which may act in concert to counteract effective immune responses and to promote tumor growth and metastasis. A variety of tumor- or stroma cells-derived soluble factors contribute to the emergence of complex local and regional immunosuppressive networks, including TGF- β , IL10, VEGF, IL6, prostaglandin E2 (PGE2), soluble FasL or MICA, Mucine 1/2, Galectin-1, and gangliosides). It was noted that these secreted factors from primary tumor site can extend immunosuppressive effects into local lymph nodes and the spleen, thereby promoting invasion and metastasis. Furthermore, some of them play a key role in the recruitment and the differentiation of immunosuppressive immune cell populations (Treg, NKT, iDC, MSC, and TAM). Tumor cells promote immunosuppressive metabolites such as nitric oxide (through iNOS), adenosine (through hypoxia), or depletion of tryptophan (through IDO) and arginine (through Arginase). In parallel, tumor cells promote their own growth and neovascularization by producing angiogenic and growth factor (FGF, HGF, AMF, and VEGF) and in remodeling the extracellular matrix by recruiting of fibroblasts, endothelial cells, pericytes, and the secretion of metalloproteases (MMP) necessary for invasive and metastatic potential. TGF- β , transforming growth factor- β ; IL, interleukin; Treg, T regulatory cell; NKT, natural killer T; iDC, immature dendritic cell; MSC, myeloid-derived suppressor cell; TAM, tumor-associated macrophage; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; FGF, fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; AMF, autocrin motility factor; VEGF, vascular endothelial growth factor, MMP, matrix metalloproteinase.

(endothelial cells, tumor cell, and autologous CD8⁺ clone) in 3D culture. Confocal microscopy monitoring in real-time showed the lysis of tumor cells (red color) but also the lysis of ECs (yellow color) by the specific CD8⁺ clone (green color) (Figure 4A, photo after 18 h of co-culture). However, the lysis of ECs required the presence of tumor cells in the 3D culture. Indeed, our results indicated the existence of a cytosolic exchange between tumor cells and ECs via the formation of gap junctions (GJs) (Figure 4B). Gap junction intercellular communication (GJIC) constitutes an important mechanism for intercellular substrate exchange, and plays a major role in the maintenance of tissue/organ homeostasis and in several human diseases. We showed the antigenic peptide transfer from tumor cells to ECs via GJs formation, which was then presented by endothelial cells-class I HLA molecules to the specific CTL clone (46). Our data provide evidence that, in addition to their capacity to kill tumor cells, anti-tumor CTLs are endowed with a certain anti-angiogenic activity. It is tempting to speculate that targeting cancer cells, as well as endothelial stromal cells cross-presenting the tumor antigen by tumor-specific CTL, may lead to the destruction of the tumor and its direct microenvironment.

Conclusions

Despite recent significant advances in the field of tumor immunology and tumor biology, knowledge about tumor–host interaction and the paradox between tumor progression and immune response induction remain yet elusive, and much remains unknown about the functional interaction between the tumor microenvironment and immune effector cells. It has become clear that the physiological behavior of CTL responses is strongly modulated/influenced by the stromal components (tumor cells, endothelial cells, fibroblasts, tumor-associated macrophages, and inflammatory cells). There may be a perfect orchestration between multiple interactions involving the stromal components and immune effectors, resulting in tumor rejection or in contrast tumor evasion and tumor progression. Furthermore, cancer cells are central to this orchestra conducting their musicians and are able to play the first keynote and to keep the tune (as summarized in Figure 5). Each component brings the factors necessary for tumor growth (growth and angiogenic factors), for the acquisition of invasive and metastatic potential (MMPs), and for suppression of immune responses including cell-mediated cytotoxicity. The analysis of transcription and proteomics patterns in tumor biopsies might permit the identification of suppressive pathways and therefore the tailoring combination therapy to overcome them. As features of the microenvironment could influence the outcome of immunotherapeutic interventions, treatments targeting tumor microenvironment in combination with ones targeting anti-tumor immune response will be required to better hit the tumor. In fact, it will be exciting to discover whether targeting the tumor microenvironment,

either alone or in combination with vaccines or T-cell adoptive transfer, will facilitate the optimal activation of anti-tumor immune responses and improve the therapeutic benefit of cancer immunotherapy. Further studies on cellular and molecular mechanisms to contribute to anti-tumor immune responses will be required to overcome immunological tolerance and promote tumor rejection.

Acknowledgment

The authors are grateful to Olivia Roland for editing the manuscript.

References

1. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; **2**: 293–9.
2. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997; **18**: 493–7.
3. Anichini A, Molla A, Mortarini R *et al.* An expanded peripheral T cell population to a cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined, melanocyte-specific antigen in metastatic melanoma patients impacts on generation of peptide-specific CTLs but does not overcome tumor escape from immune surveillance in metastatic lesions. *J Exp Med* 1999; **190**: 651–67.
4. Janke J, Schluter K, Jandrig B *et al.* Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med* 2000; **191**: 1675–86.
5. Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 2008; **371**: 771–83.
6. Thiery J, Dorothee G, Haddada H *et al.* Potentiation of a tumor cell susceptibility to autologous CTL killing by restoration of wild-type p53 function. *J Immunol* 2003; **170**: 5919–26.
7. Thiery J, Abouzahr S, Dorothee G *et al.* p53 potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005; **174**: 871–8.
8. Abouzahr S, Bismuth G, Gaudin C *et al.* Identification of target actin content and polymerization status as a mechanism of tumor resistance after cytolytic T lymphocyte pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 1428–33.
9. Abouzahr-Rifai S, Hasmim M, Boukerche H *et al.* Resistance of tumor cells to cytolytic T lymphocytes involves Rho-GTPases and focal adhesion kinase activation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 31665–72.
10. Glinsky GV, Glinsky VV. Apoptosis and metastasis: a superior resistance of metastatic cancer cells to programmed cell death. *Cancer Lett* 1996; **101**: 43–51.
11. Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett* 1997; **115**: 185–93.

12. Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 2003; **22**: 3152–61.
13. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; **22**: 3138–51.
14. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 449–58.
15. Hamai A, Meslin F, Benlalam H *et al.* ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res* 2008; **68**: 9854–64.
16. Jenkinson SR, Williams NA, Morgan DJ. The role of intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 interactions in the generation of tumor-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2005; **174**: 3401–7.
17. Yasuda M, Tanaka Y, Tamura M *et al.* Stimulation of beta1 integrin down-regulates ICAM-1 expression and ICAM-1-dependent adhesion of lung cancer cells through focal adhesion kinase. *Cancer Res* 2001; **61**: 2022–30.
18. Kuhn JR, Poenie M. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 2002; **16**: 111–21.
19. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001; **15**: 751–61.
20. van der Merwe PA. Formation and function of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 2002; **14**: 293–8.
21. Lebedeva T, Dustin ML, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2005; **17**: 251–8.
22. Lefor AT, Fabian DF. Enhanced cytolytic activity of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) derived from an ICAM-1 transfected tumor in a murine model. *J Surg Res* 1998; **75**: 49–53.
23. Sartor WM, Kyprianou N, Fabian DF, Lefor AT. Enhanced expression of ICAM-1 in a murine fibrosarcoma reduces tumor growth rate. *J Surg Res* 1995; **59**: 66–74.
24. Turner J, Rhee JG, Fabian DF, Lefor AT. Expression of ICAM-1 enhances *in vivo* lymphocyte adhesion in a murine fibrosarcoma. *J Surg Oncol* 1997; **66**: 39–44.
25. Johnson JP, Lehmann JM, Stade BG, Rothbacher U, Sers C, Riethmuller G. Functional aspects of three molecules associated with metastasis development in human malignant melanoma. *Invasion Metastasis* 1989; **9**: 338–50.
26. Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R *et al.* Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res* 1990; **50**: 1271–8.
27. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 131–42.
28. Vernon AE, LaBonne C. Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr Biol* 2004; **14**: R719–21.
29. Cho HJ, Baek KE, Saika S, Jeong MJ, Yoo J. Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **353**: 337–43.
30. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 2009; **15**: 195–206.
31. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006; **441**: 437–43.
32. Frederiksen LJ, Sullivan R, Maxwell LR *et al.* Chemosensitization of cancer *in vitro* and *in vivo* by nitric oxide signaling. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 2199–206.
33. Postovit LM, Sullivan R, Adams MA, Graham CH. Nitric oxide signalling and cellular adaptations to changes in oxygenation. *Toxicology* 2005; **208**: 235–48.
34. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 2007; **26**: 319–31.
35. Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 2004; **9** (Suppl 5): 10–7.
36. Hussain SF, Kong LY, Jordan J *et al.* A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients. *Cancer Res* 2007; **67**: 9630–6.
37. Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* 2009; **69**: 2506–13.
38. Ozao-Choy J, Ma G, Kao J *et al.* The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res* 2009; **69**: 2514–22.
39. Chouaib S. Integrating the quality of the cytotoxic response and tumor susceptibility into the design of protective vaccines in tumor immunotherapy. *J Clin Invest* 2003; **111**: 595–7.
40. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P *et al.* Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 2009; **29**: 2570–81.
41. Mellor HR, Harris AL. The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007; **26**: 553–66.
42. Wilkinson S, O'Prey J, Fricker M, Ryan KM. Hypoxia-selective macroautophagy and cell survival signaled by autocrine PDGFR activity. *Genes Dev* 2009; **23**: 1283–8.
43. Limmer A, Ohl J, Kurts C *et al.* Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000; **6**: 1348–54.
44. Savinov AY, Wong FS, Stonebraker AC, Chervonsky AV. Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 2003; **197**: 643–56.
45. Valujskikh A, Lantz O, Celli S, Matzinger P, Heeger PS. Cross-primed CD8(+) T cells mediate graft rejection via a distinct effector pathway. *Nat Immunol* 2002; **3**: 844–51.
46. Benlalam H, Jalil A, Hasmim M *et al.* Gap junction communication between autologous endothelial and tumor cells induce cross-recognition and elimination by specific CTL. *J Immunol* 2009; **182**: 2654–64.

Cytokeratin 18 expression pattern correlates with renal cell carcinoma progression: Relationship with Snail

YOSRA MESSAI^{1,2}, MUHAMMAD ZAEEM NOMAN¹, AMINE DEROUICHE³, NADIA KOURDA⁴,
INTISSAR AKALAY¹, MERIEM HASMIM¹, IZABELA STASIK¹, SARRA BEN JILANI²,
MOHAMED CHEBIL³, ANNE CAIGNARD⁵, BRUNO AZZARONE⁶, ASMA GATI²,
AMEL BEN AMMAR ELGAAIED² and SALEM CHOUAIB¹

¹INSERM, U 753, Laboratoire d'Immunologie des Tumeurs Humaines: Interaction effecteurs cytotoxiques-système tumoral, Institut Gustave Roussy Villejuif; ²Laboratoire de Génétique, d'Immunologie et de Pathologies Humaines, Faculté Des Sciences De Tunis; ³Service d'Urologie, Hôpital Charles Nicolle de Tunis; ⁴Laboratoire de Cytologie et d'Immunopathologies, Hôpital Charles Nicolle de Tunis; ⁵Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Inserm U567, Paris; ⁶INSERM, UMR 542, Université de Paris XI, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

Received October 27, 2009; Accepted December 7, 2009

DOI: 10.3892/ijo_00000597

Abstract. Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of kidney cancer and recent developments in the molecular biology of RCC have identified multiple pathways associated with the development of this cancer. This study aimed at analyzing the expression pattern of cytokeratin 18 (CK18) in RCC patients and its prognostic relevance. We quantified CK18 mRNA expression and protein using real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-QPCR) and immunohistochemistry, respectively, in paired tumor and non-tumor samples from 42 patients. Our data indicate that CK18 mRNA and proteins levels increased with advanced stage and grade of the disease. Using primary (RCC5) and metastatic renal cell carcinoma (RCC5 met) cell lines, we demonstrated that CK18 expression was 5-fold higher in the metastatic as compared to the primary RCC cell line and correlated with a migratory phenotype characterized by a distinct elongated morphology as revealed by Phalloidin staining. In addition, RCC5 met cells displayed an increased capacity to attach to fibronectin and collagen which was lost following CK18 knock-down. Our data also indicate that the expression of CK18 was associated with increased Snail expression which correlated positively with advanced disease in RCC patients. The present findings suggest that CK18 may play an important role in the progression of RCC and it may be used as a new predictor for RCC.

Introduction

Renal cell carcinoma is the most common form of kidney cancer arising from the renal tubule (1). It accounts for 3% of all adult malignancies and is the most lethal of the common urologic cancers (2). Approximately 20-30% of patients present with metastatic disease, and 20-40% of patients undergoing nephrectomy for clinically localized renal cell carcinoma will develop metastases (3). Since renal-cell carcinoma is highly resistant to chemotherapy, interleukin-2 or interferon- α are widely used as first-line treatment of metastatic disease. Although tumor stabilization and regression have been observed with immunotherapy, the clinical benefit of this treatment is insufficient to halt the spread of disease. Response rates with these cytokines are low and response rates with metastatic renal cell carcinoma range from 15 to 30% (4). Recent advances in the understanding of the pathogenesis, behavior, and molecular biology of metastatic renal cell carcinoma (RCC) have paved the way for developments that may enhance early diagnosis, improve prognostication, and prolong survival (5,6).

In a variety of human malignancies, tumor progression is associated with changes in intermediate filament (IF) expression (7). IFs provide crucial structural support in higher eukaryotic cells and accumulating evidence shows that IFs also participate in various cellular activities including stress responses, cell growth, cell death and cell migration. In epithelial cells, the predominant IF proteins are the keratins, a multigene family of proteins that are divided into type I (K9-K20) and type II (K1-K8) subclasses. Members of the two subclasses form non-covalent hetero-polymers in a 1:1 ratio, and are further assembled into keratin filaments.

The expression of keratins is tissue specific, and is tightly regulated during differentiation. Cytokeratin 8 (CK8) and Cytokeratin 18 (CK18) are the major components of IFs in simple-type epithelial cells, including those in the liver, lung, kidney, pancreas, mammary gland and in tumors that arise

Correspondence to: Dr Salem Chouaib, INSERM U753, Laboratoire d'Immunologie des tumeurs Humaines: Interaction effecteurs cytotoxiques-système tumoral, Institut Gustave Roussy, PR1, 94805 Villejuif Cedex, France
E-mail: chouaib@igr.fr

Key words: renal cell carcinoma, CK18, tumor progression, Snail

from these organs. In this regard, CKs are particularly useful tools for the surveillance of carcinomas. Besides their cell structural support and their role in providing mechanical stability to tissues, CKs are implicated in a range of pathological phenotypes seen in patients bearing mutations in epidermal keratins. In addition, evidence has shown that CK18 filaments play an important role in modulating cellular response (8,9).

Snail is a zinc finger transcription factor that triggers the epithelial-mesenchymal transition (EMT) by directly repressing E-cadherin expression and has been implicated in tumor progression (10,11). Recent data have provided evidence that Snail expression is required for metastatic dissemination. Currently, it seems that Snail may play a role in maintenance of the invasive phenotype (12,13). While preliminary information from expression microarray data sets from primary human breast cancers suggests that high levels of Snail are correlated with poor clinical outcome for women with early breast cancer (14), the involvement of Snail in RCC progression and its relationship with CK18 has not yet been established. Although to date, a small number of possible marker genes are known to predict RCC behavior more accurately, a reliable marker for early diagnosis of RCC has not been reported (15). Since RCC is believed to arise from proximal tubule epithelium (16,17) and in order to identify new prognosis markers for clear cell RCC, we have examined in the present study the relationship between CK18 and Snail expression in RCC. Our findings point to the existence of a relationship between CK18 and RCC progression as well as a role for Snail during this process.

Patients and methods

Patients. The immunohistochemistry study was based on data obtained from the treatment of 40 clear cell carcinomas surgically resected between 2004 and 2008 at the Division of Urology, Charles Nicolle Hospital, Tunisia. Hematoxylin and eosin (H&E) stained sections for all 40 specimens were reviewed in a blind manner by one pathologist (Table I). Samples for RT-QPCR were obtained from 42 patients with histologically confirmed clear cell subtype RCC, who had not received pre-operative therapy (Table II). Tumors were resected between 2006 and 2009. The staging of tumors was carried out according to the International Union against Cancer (UICC) standards, based on routine imaging methods and laboratory tests. Normal renal tissue (n=5) obtained from kidneys removed because of benign diseases were used to normalize real-time PCR experiments. Appropriate written consent was obtained to use the material in our study.

Cell lines. Primary and metastatic renal cell carcinoma cell lines RCC5 and RCC5 met respectively were obtained from the same patients with conventional RCC as described previously (18). Cells were cultured in DMEM/F12 1:1 medium containing 10% heat inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 1% Ultrosor G (Gibco BRL, Life Technologies, Cergy Pontoise, France) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. NK cells were negatively selected from healthy donor peripheral blood mononuclear cells with NK cell isolation kit II (Miltenyi Biotec).

Table I. Summary of clinicopathological findings for RCC patients (immunohistochemistry).

Characteristics	No. of cases (n=42)
Sex	
Male	23
Female	19
Metastasis at first diagnosis or recurrent metastasis	3
Tumor stage	
pT1	17
pT2	17
pT3	8
pT4	0
Tumor grade	
I	7
II	13
III	22
IV	0

Table II. Summary of clinicopathological findings for RCC patients (real-time PCR).

Characteristics	No. of cases (n=42)
Sex	
Male	24
Female	16
Metastasis at first diagnosis or recurrent metastasis	1
Tumor stage	
pT1	21
pT2	15
pT3	4
pT4	0
Tumor grade	
I	12
II	13
III	15
IV	0

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin wax embedded samples. Immunostaining was performed with the mouse anti-human CK18

antibody (1:100, clone DC10, Dako) and the Dako ChemMate Detection kit. Application of the primary antibody was followed by incubation with biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin secondary reagent (1:100) for 35 min. After rinsing in TBS, the slides were then incubated in Dako Duet (K0492) streptavidin-biotin-horseradish peroxidase complex for 35 min, rinsed in TBS and mounted.

The number of CK18-positive cells by immunostaining in each tumor sample was estimated by the same pathologist in a consecutive analysis of all samples on 1 day to ensure maximal internal consistency. The staining results were grouped into normal CK18 expression (100% stained cells), heterogeneous CK18 expression (>10% and <100% stained cells), and complete loss of CK18 expression (<10% stained cells).

Real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-QPCR). Total RNA extraction was performed with TRIzol reagents. Tissue expression of CK18 and Snail was analyzed using single-stranded cDNA synthesized from 1 μ g of total RNA by SuperScript RTII (Life Technologies, Inc.) and a random hexamer primer. Each gene was run in duplicates (40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min) using SYBR Green chemistry on the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Samples were independently analyzed 2-3 times. Primer sequences (forward and reverse) were as follows: CK18, 5'-GAGCCTGGAGACCGAGAAC-3' and 5'-TTG CGAAGATCTGAGCCC-3'. Snail, 5'-GAGGCGGTGG CAGACTAG-3' and 5'-GACACATCGGTCAGACCAG-3'. Data analysis involved the Δ CT method for relative quantification.

Confocal microscopy. Tumor cells were grown on glass coverslips, fixed with 3% formaldehyde/PBS for 10 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 5 min, followed by blocking with 1% bovine serum albumin/PBS for 20 min. The fixed cells were then stained with Alexa Fluor 568-phalloidin (Molecular Probes) for actin staining and with anti-CK18 antibody for CK18 staining followed by Alexa-488 secondary antibody (Molecular Probes). Coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and analyzed by a Zeiss laser scanning confocal microscope (LSM-510, Jena, Germany). Images were later on analyzed by using LSM Image Examiner software (Zeiss).

Western blot analysis. Western blotting was performed as described earlier (19). Total cellular extracts were prepared by lysing cells in ice-cold buffer containing 1% NP40, 1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, and 10 μ g/ml leupeptin. Equivalent protein extracts (30-50 μ g) were denatured by boiling in SDS and β -mercaptoethanol, separated by SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes (Pierce/Perbio). Blots were then blocked for 1 h with TBS containing 5% non-fat dry milk and probed with appropriate antibody for 3 h with either anti-CK18 (mouse mAb, Dako) or anti-Snail (mouse mAb, Cell Signaling). After washing, blots were incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The complexes were detected

using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce/Perbio).

RNA interference. Gene silencing of CK18 expression was performed by using sequence-specific siRNA, purchased from Qiagen. RNAi experiments were performed as previously reported (19). Briefly, cells were transfected by electroporation with 200 pmol siRNA in a Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad; 300 V, 500 μ F) and then allowed to grow for 72 h. Human siRNA target sequences used for CK18 were 5'-GCCGGAUAGUGGAUGCAA-3' and 5'-GCAUCGUUCUGCAGAUUGA-3'. SiRNA targeting Luciferase, purchased from Sigma-Proligo, was used as a negative control.

Wound healing (migration) assay. RCC5 and RCC5 met were seeded at 1×10^6 in 60-mm diameter culture dishes. Cells were gently scraped with a plastic tip to make wounds. The medium was removed, cells were washed twice with PBS, and serum-free medium was added along with mitomycin-D. The cells were allowed to migrate into the area of wounds for 24 and 48 h. Afterwards, cultures were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with 0.5% crystal violet. Migration was assessed by taking pictures of three different regions of each wound at 24 and 48 h. Results are representative of three separate experiments.

Adhesion assay. Ninety-six-well plates were coated with type-I collagen (3 μ g/ml), type-IV collagen (3 μ g/ml), osteopontin (5 μ g/ml), or fibronectin (5 μ g/ml) overnight at 4°C and washed with PBS as described earlier (20). Briefly, cells were detached with PBS-EDTA and seeded in serum-free medium at a concentration of 10^4 cells/well. After 1 h at 37°C wells were gently washed with phosphate-buffered saline, and attached cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with 0.5% crystal violet. Absorbance of each well was read at 620 nm in a plate reader. Results are expressed as mean value of triplicate determinations.

Cell death analysis. Cells were plated in a 6-well plate at a density of 5×10^4 cells/well and grown overnight. The medium was replaced with either fresh medium (control medium) or with medium supplemented with various concentrations of TRAIL. Early apoptosis was assessed by flow cytometry using Dioc6 and propidium iodide staining analyzed on a FACSCalibur flow cytometer. Data were processed using CellQuest software (Becton-Dickinson) as previously reported (21).

Cytotoxic activity assay. The cytotoxic activity of the NK cells was measured by a conventional 4-h Cr^{51} release assay (22) by using triplicate cultures in round-bottomed 96-well plates. After 4 h of co-culture supernatants were transferred to LumaPlate-96-wells (Perkin-Elmer), dried down, and counted on a Packard TopCount NXT. Percentage of specific cytotoxicity was calculated conventionally.

Statistical analysis. RT-QPCR results are presented as means \pm SD per group. ANOVA was used to compare groups, followed by multiple comparisons using Bonferroni's post-

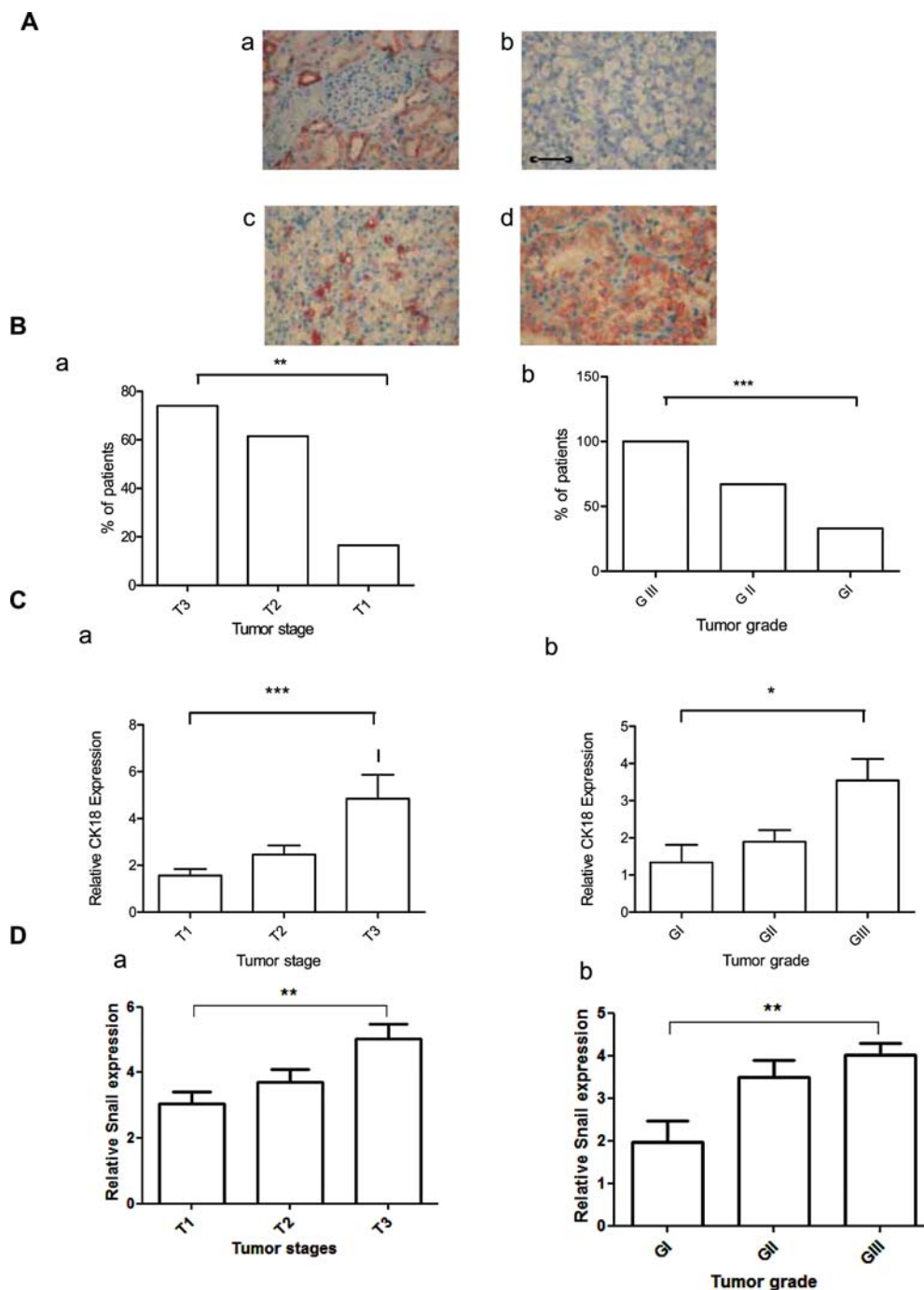


Figure 1. Relationship between CK18, Snail levels and RCC progression. (A) Cytokeratin 18 (CK18) expression levels in renal cell carcinoma (RCC). Immunohistochemical staining of normal kidney and RCC tumors with CK18 monoclonal antibody. Overview of 3 groups of patients according to CK18 expression rate (bar, 25 μ m). a, Normal kidney. b, Patients with <10% stained tumor cells. c, Patients with 10 to 100% (>10% and <100%) stained tumor cells. d, Patients with 100% stained tumor cells. (B) Relationship between immunohistochemical CK18 expression and clinical features. a, Correlation between CK18 expression and tumor stage: percentage of patients with 100% stained tumor cells. b, Correlation between CK18 expression and tumor grade: percentage of patients with 100% stained tumor cells. (C) Relationship between CK18 mRNA expression levels in RCC patients and clinical features. Expression analysis for CK18 was performed by real-time PCR and was normalized to normal renal tissue. a, Correlation between CK18 expression and tumor stage. b, Correlation between CK18 expression and tumor grade. (D) Relationship between Snail expression in RCC patients and clinical features. Expression analysis by RT-QPCR for Snail is relative to 18S rRNA and normalized to normal renal tissue. a, Correlation between Snail expression and tumor stage. b, Correlation between Snail expression and tumor grade.

test and t-test. In all cases, differences were considered significant at: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Results

The increased expression of CK18 and Snail in RCC patients is associated with advanced tumor stages. CK18 expression

was analyzed in RCC tumors from 42 patients by immunohistochemistry using anti-CK18 mAb on formalin fixed, paraffin wax embedded samples. As shown in Fig. 1A, positive CK18 staining was found in the cell membrane and cytoplasm of all normal tissues of proximal and distal tubules and collecting ducts, while no or weak CK18 expression was observed in the glomerular cells. For RCC patients, three groups were clearly

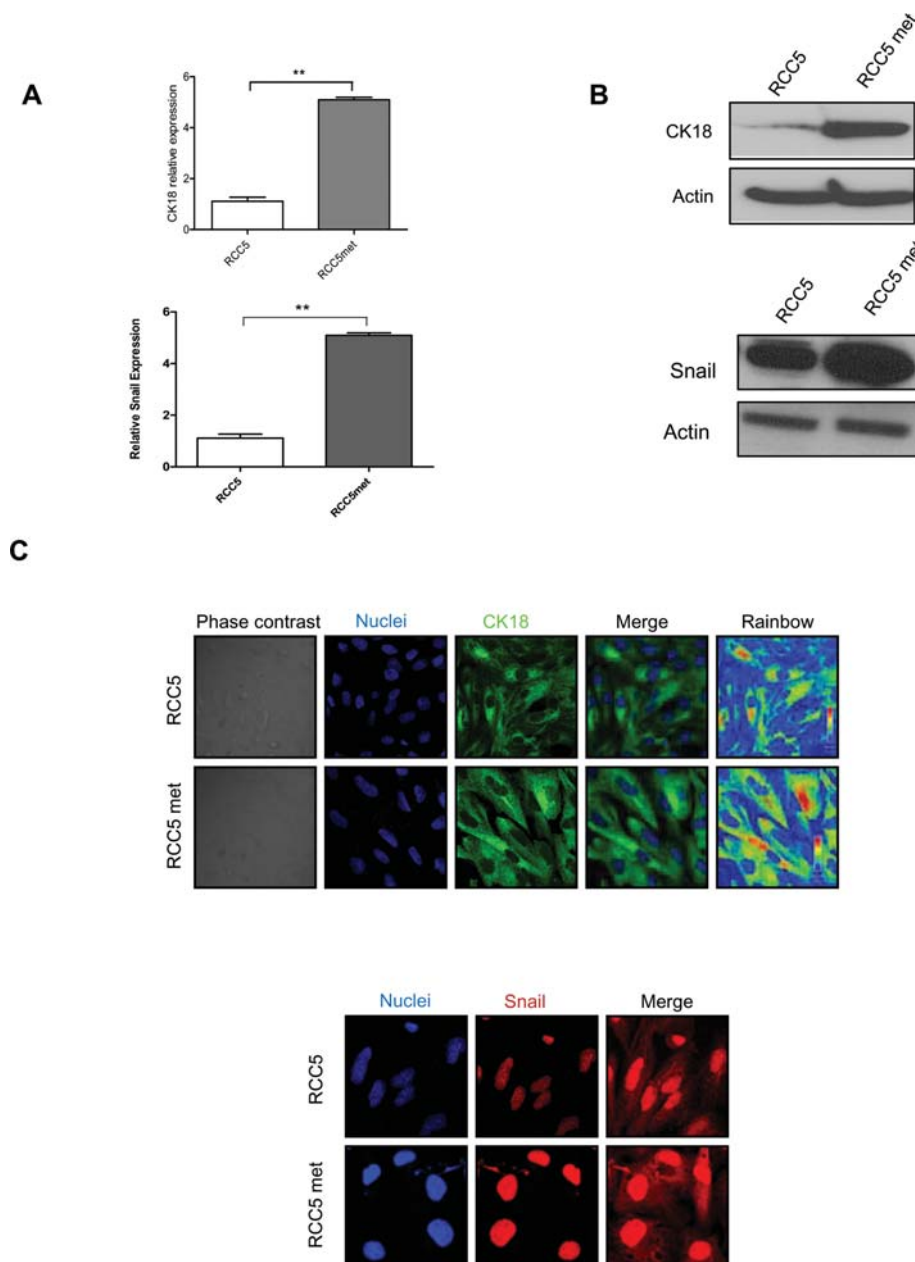


Figure 2. CK18 and Snail levels in primary (RCC5) and metastatic (RCC5 met) cell lines. (A) The expression of CK18 and Snail genes in primary RCC5 and metastatic RCC5 met cell lines was assessed by quantitative RT-PCR. Columns represent mean of three independent experiments; bars, \pm S.D. $^{**}P \leq 0.01$. Experimental values were normalized to those for the 18S gene. (B) CK18 and Snail expression in RCC5 and RCC5 met cells was determined by Western blot analysis. Actin was used as a loading control. (C) Confocal microscopy analysis of CK18 and Snail protein levels in RCC5 and RCC5 met. Cells were grown on glass coverslips, stained with the appropriate antibody and followed by staining with Alexa-488 secondary antibody. Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope was used for analysis. Data are from one representative experiment of at least three.

distinguishable according to the rate of CK18 expression in tumor cells: patients with <10% stained tumor cells (Fig. 1Ab), patients with heterogeneous stained tumor cells (>10% and <100%, Fig. 1Ac) and patients with 100% stained tumor cells (Fig. 1Ad). Data depicted in Fig. 1B and C (RT-QPCR) indicate that CK18 expression increases according to stage and grade of RCC. We next explored possible correlations between CK18 expression levels and various clinicopathologic characteristics in RCC cases. We evaluated the expression pattern of CK18 by immunohistochemical analysis. We observed that CK18 mRNA levels in human RCC specimens significantly correlate with tumor grade and stage. These results suggest that the CK18 expression pattern could be of predictive value as a marker of disease progression.

In order to evaluate the existence of a correlation between Snail expression and RCC progression, RT-QPCR analysis was performed on patient samples. Similar to what was seen with CK18, we observed that relative Snail expression was higher in RCC patients with either advanced disease stage T3 or advanced disease grade GIII (Fig. 1D).

Differential expression of CK18 and Snail in primary and metastatic RCC cell lines. We investigated CK18 and Snail expression in primary (RCC5) and metastatic (RCC met) RCC cell lines we had previously established from RCC patient biopsies. Using RT-QPCR, data shown in Fig. 2A indicate that the metastatic RCC cell line expressed ~5-fold higher levels of CK18 mRNA than the primary cells. Similarly the

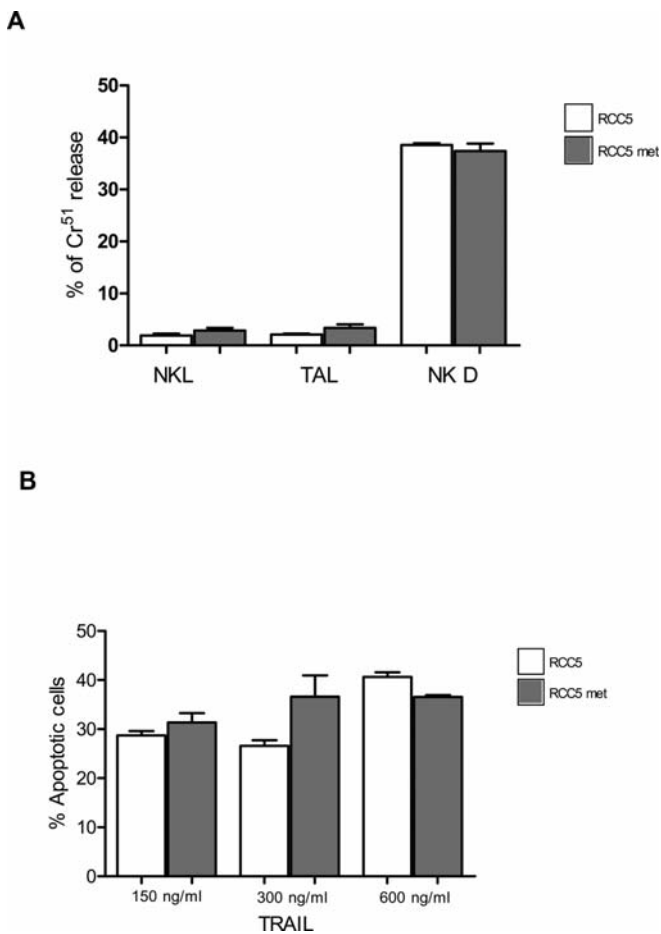


Figure 3. Sensitivity of RCC5 and RCC5 met to NK, TALL and TRAIL mediated lysis. (A) RCC5 and RCC5 met were co-cultured with NK cell line, NK isolated from healthy donors and TALL-104 (ATCC CRL-11386). Cytotoxicity was determined by a conventional 4-h Cr⁵¹-release assay with different effectors at different ratios. Bars, \pm SD. (B) RCC5 and RCC5 met tumor cells were incubated with recombinant Trail (150, 300 and 600 μ g/ml) for the indicated times, and cell death was measured by DIOC6 and PI staining.

expression of Snail was higher in RCC5 met as compared to RCC5. Fig. 2B shows the results of Western blot analysis confirming the increased expression of CK18 and Snail proteins in the metastatic RCC cell line. These observations were further confirmed by confocal microscopy analysis (Fig. 2C) showing an over-expression of CK18 and Snail in the metastatic RCC5 cell line.

The increased expression of CK18 does not interfere with RCC cell response to NK-mediated cytotoxicity and TRAIL-induced apoptosis. We asked whether the differential expression of CK18 by RCC5 and RCC5 met cell lines correlates with their susceptibility to NK cell- and TRAIL-induced cell death by investigating their cytotoxic response to human NK cells and to TRAIL. Data shown in Fig. 3A clearly indicate that the killing response by cytotoxic effectors (NKL, TALL and peripheral NK) was not affected by the level of CK18 expressed in primary and metastatic targets. In addition, the data depicted in Fig. 3B indicate that RCC5 and RCC5 met display a similar cytotoxic response following treatment with TRAIL suggesting that CK18 does not interfere with the apoptotic machinery in these cells.

Differential adhesive and migratory potential of RCC5 and RCC5 met. Phalloidin staining revealed morphological changes observed in metastatic cells as compared to the primary cell line. In fact, RCC5 met display a migratory phenotype characterized by an elongated morphology, disorganized actin cytoskeleton and the presence of cell extensions associated with a marked increase in filamentous actin cellular content (Fig. 4A). We compared also the adhesive properties of the two RCC cell lines to defined components of the extracellular matrix. We found that metastatic cells RCC5 met attach better to different cell matrices especially fibronectin and collagen I in comparison to the primary cells RCC5 (Fig. 4B).

We next examined the cell motility of RCC5 and RCC5 met on plastic substrate by determining the rate of wound closure after scraping cells from an area of monolayer cultures. Confluent monolayer cells were scraped, and cells were allowed to migrate for 24 and 48 h in serum deprived medium added with mitomycin-C to inhibit cell proliferation. Primary cell line RCC5 showed an obviously slower closure rate at both 24 and 48 h when compared with metastatic cells RCC5 met (Fig. 4C).

Silencing of CK18 in RCC5 met resulted in the loss of the migratory phenotype. To further assess the putative role of CK18 in migration and adhesion of metastatic cells, transfection of RCC5 met cell line with small interfering RNA (siRNA) targeting CK18 was performed. A specific and efficient reduction of the level of CK18 protein as compared to control siRNA was observed 72 h after transfection (Fig. 5A). Knockdown of CK18 was accompanied by a decrease in adhesion of metastatic cells to fibronectin and collagen I (Fig. 5B). In addition, as depicted in Fig. 5C, CK18 silencing in RCC5 met resulted in morphological changes showing that RCC5 met acquired shape and monolayer organization similar to that exhibited by RCC5 cells. We further demonstrated that the loss of CK18 in the RCC5 met resulted in the loss of elongated cells (Fig. 5C). All these changes may reflect an attenuation of cell migratory properties.

Discussion

Renal cell carcinoma (RCC) represents five percent of adult epithelial cancers and clear cell RCC is the most frequent histological subtype. Improved understanding of the molecular pathways implicated in the pathogenesis of RCC has led to the development of specific targeted therapies to treat the disease. In particular, CK18 is attracting considerable interest as a response biomarker during clinical trials of anticancer drugs. Given the important role of CK18 in cell adhesion, cell migration, and signal transduction, which are of major importance in tumor invasion and metastasis, it seemed reasonable to investigate the effect of CK18 expression on patient outcome in renal cell carcinoma. Here we evaluated the expression pattern of CK18 in renal cell carcinoma by immunohistochemical analysis of RCC tumors and studied the correlation between CK18 expression and tumor stage and grade. The comparison of the CK18 expression pattern with different clinicopathological risk factors revealed a highly significant correlation to the size and differentiation grade of the tumor. These parameters are, among other factors, a

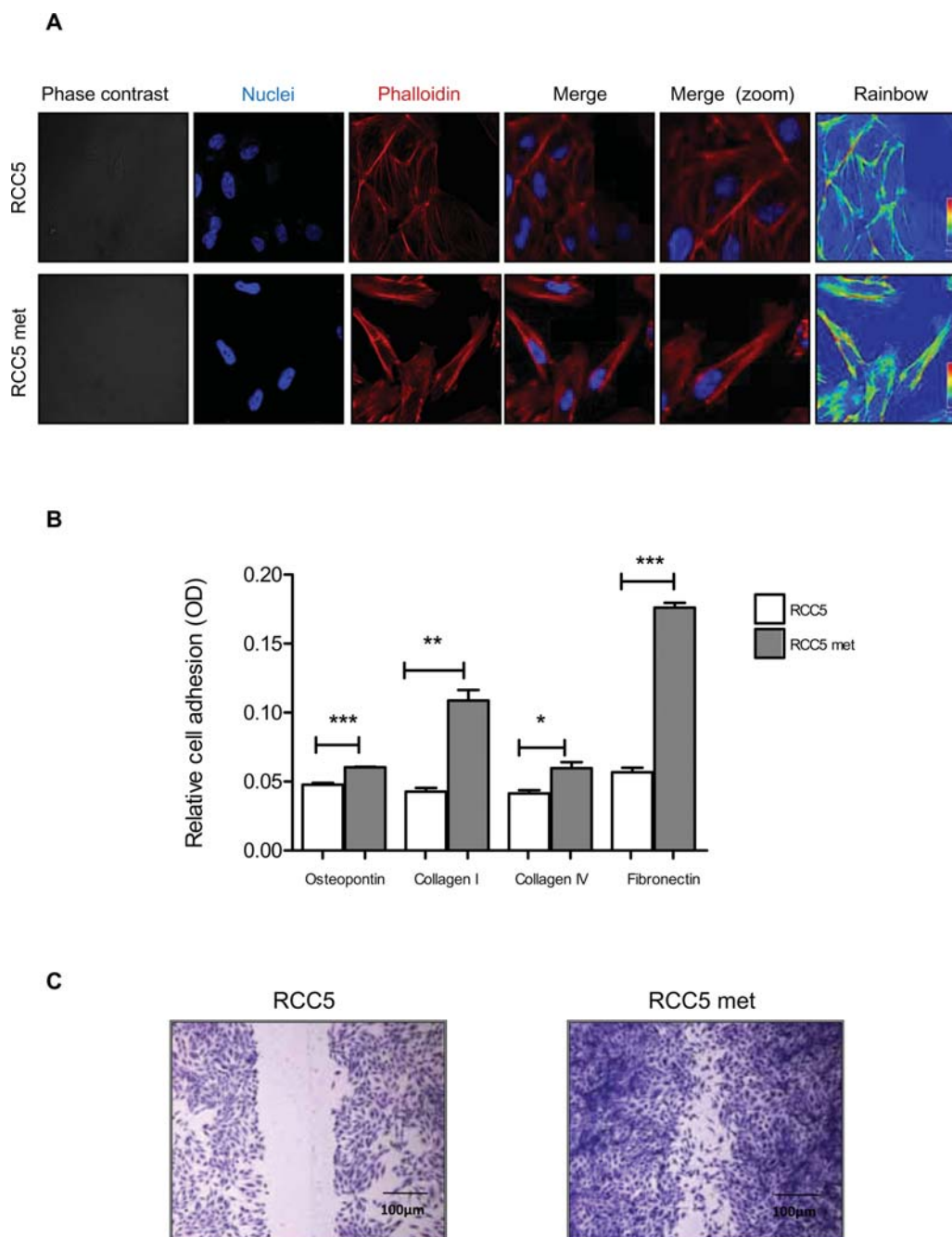


Figure 4. Differential adhesive and migration properties of RCC5 and RCC5 met. (A) RCC5 and RCC5 met were grown on glass coverslips and stained with Rhodamine-phalloidin before analyzing with a Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope. (B) Renal carcinoma cell line adhesion. RCC5 and RCC5 met were tested for their ability to adhere to osteopontin, collagen I, collagen IV and fibronectin. Results are expressed in optical density units (OD) units as a mean of triplicate values \pm SD. (C) Renal carcinoma cell line migration assay. RCC5 and RCC5 met were permitted to migrate into the wound area of monolayer cultures and photomicrographs were taken at 24 h. Results are representative of three separate experiments.

function of the proliferative rate of the primary tumor, suggesting a possible relationship between higher CK18 expression and increased proliferative activity and survival. Moreover, we observed in some early stages and low grade tumors the loss of expression of CK18 as compared with normal renal cells. According to these observations, three hypotheses could be advanced to explain the variation level of CK18 expression in RCC following tumor grades and stages: i) decreased CK18 expression is only needed in low tumor grades and stages to have tumor progression; this expression may be restored in high tumor grade; ii) combination of

mutations in different genes may be associated with the weak CK18 expression in low grade phenotype; or iii) the immune system may be effective at low grades of RCC in eliminating CK18 expressing tumor cells but ineffective at high grades. Recently, Walter *et al* reported a high frequency of CK18 specific CD8 T cells in healthy donors using an HLA-A2 tetramer refolded with a nonameric peptide isolated from RCC primary tumor (23,24). These potentially autoreactive T cells may play an essential role in controlling tumor growth.

This suggests an important functional role of this protein in the development or progression of the disease. The variation

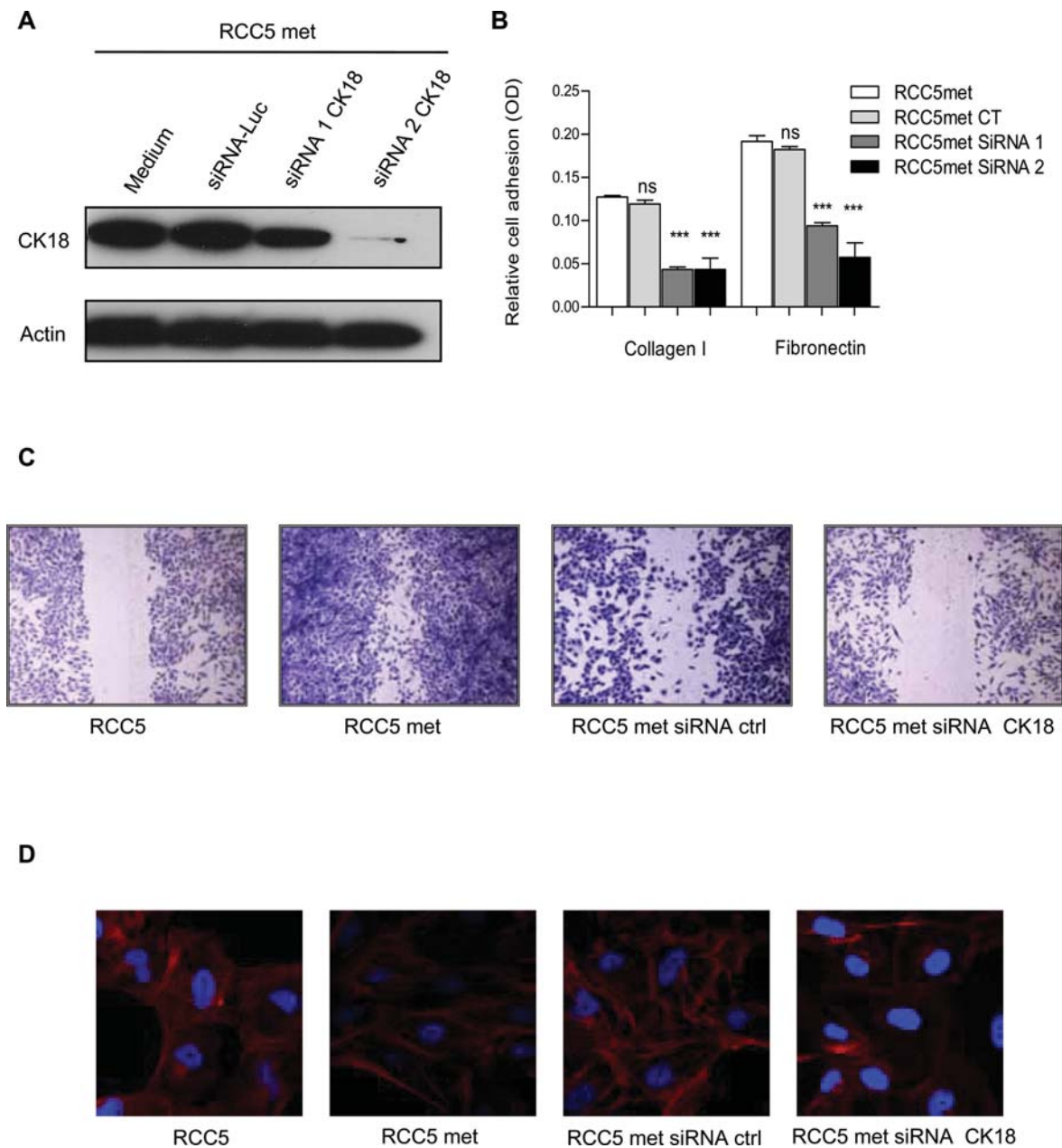


Figure 5. Cytokeratin 18 knock-down resulted in the modulation of RCC5 met tumor cell morphology and its adhesive and migratory properties. (A) Knock-down of CK18 down-regulates the protein expression. RCC5 met cells were transfected with either 2 different sequences of CK18 siRNA, or scramble control siRNA (control). Whole-cell lysates were subjected to SDS-PAGE, blotted, and probed with a specific antibody, as indicated. Actin was used as a loading control. (B) RCC5 met transfected with control siRNA (CT) or CK18 siRNA were tested for their ability to adhere to collagen I and fibronectin. Results are expressed in optical density units (OD) units as a mean of triplicate values \pm SD. (C) RCC5 met transfected with control siRNA (CT) or CK18 siRNA were tested for their ability to migrate in a wound healing assay. (D) RNA interference-mediated silencing of CK18 in RCC5 met was accompanied by a change in tumor cell morphology.

of CK18 at protein levels seems to be correlated with mRNA level. The results presented here show that advanced tumor grade and stage of RCC are associated with CK18 mRNA expression. It should be noted that several correlative studies between CK18 expression and prognostic value were previously established with discrepant results depending on the primary tumoral site. In this respect, an association between the induction of CK18 and a poor prognostic outcome has been established in carcinoma of the oral cavity (25) and in non-small cell lung cancer (26). Cintorino *et al* suggested that CK8, CK18 and CK19 expression and distribution patterns

could be of predictive value as markers of disease progression as defined by the appearance of lymph node metastases in oesophageal squamous cell cancer (27).

In this context, one issue was to identify the functional consequences of such expression on tumor behaviour. For this purpose, we used a primary RCC cell line and its metastatic derivative which we have previously established (18). We assessed first using different methods the differential behaviour of the primary and metastatic cell lines including their susceptibility to NK- and Trail-induced cell death and of their adhesion and migration capability. We found that the two cell

lines have the same response to NK cytotoxicity and Trail induced apoptosis. However, RCC5 met cell line displays morphological changes characteristic of migration phenotype associated with higher adhesion and migration capability as compared to RCC5 primary cell line. This would indicate that, in this case, contrary to immune escape mechanisms, the acquisition of a migratory phenotype is an important feature for tumor progression. It is well established that epithelial cell and tissue architecture is largely determined by cytoskeletal filaments, which are part of an intracellular protein network comprising the cytoskeleton itself, junctional complexes at the cell border, and numerous associated proteins. Previous studies showed that changes in the composition of the cytoskeleton expression result in an increased plasticity, which is required for epithelial tumor cells to become mobile and invasive. Indeed, most cancer cells do not have the physical properties of leukocytes to invade tissues, circulate in the blood, and re-enter new organs. Therefore, epithelial tumor cells need to undergo a fundamental phenotypical change called epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) toward more dedifferentiated and malignant states. To investigate the functional consequences of CK18 overexpression and to assess whether its expression patterns could represent putative markers of tumor progression, we analysed CK18 mRNA in both cell lines and found that CK18 was significantly increased in metastatic RCC cell line. Moreover, siRNA targeting CK18 in RCC5 met line resulted in attenuation of cell migratory and adhesive properties. In the present study we clearly indicate that over expression of CK18 correlated with migratory phenotype characterized by a distinct elongated morphology. Cytokeratin 18 appears to interfere with tumor progression without attenuating tumor cell susceptibility to cell or ligand mediated cytotoxicity despite a change in cell morphology. Our findings fit with recent reports indicating that elevated CK expression is associated with invasion and metastasis and points to its involvement in dynamic cell remodelling during cancer progression (26,28,29). They also show that metastatic renal cells display increased cellular motility, which might indicate increased tumor aggressiveness and poor patient prognosis. However, findings from other groups have challenged the value of CK18 as a putative suppressor of tumor progression in breast cancer (30).

Several studies have associated changes in CK expression with an altered cellular behaviour (31,32). In this respect, it has been reported that the overexpression of the CK18 gene in tumorigenic cells could result from a high level of acetylation of histones and/or of factors controlling the activity of the transcription complex (33).

In the course of these studies, we also showed that the expression of the transcription factor Snail was positively correlated with advanced disease in RCC patients. This fits with its increased expression in RCC5 met as compared to primary RCC line. This expression pattern of Snail in patients and cell lines correlate with that of CK18. Taking into account, this observation as well as Snail function and its role as mediator of cell survival, we suggest that Snail could play a role in the regulation of CK18 expression. Preliminary results using siRNA targeting Snail in RCC5 met led to CK18 overexpression (data not shown) in spite of concomitant increase of CK18 and Snail in high grades and stages. A

better understanding of the mechanisms associated with CK18 transcription and its involvement in the control of tumor behaviour may therefore allow for the design of improved therapeutic strategies in RCC.

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM (Cooperation INSERM/DGRST), the 'Association pour la recherche contre le cancer' (ARC). Yosra Messai is a recipient of a fellowship from INSERM/DGRST.

References

- Oosterwijk E, van Muijen GN, Oosterwijk-Wakka JC and Warnaar SO: Expression of intermediate-sized filaments in developing and adult human kidney and in renal cell carcinoma. *J Histochem Cytochem* 38: 385-392, 1990.
- Pantuck AJ, Zisman A and Belldegrun A: Biology of renal cell carcinoma: changing concepts in classification and staging. *Semin Urol Oncol* 19: 72-79, 2001.
- Janzen NK, Kim HL, Figlin RA and Belldegrun AS: Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *Urol Clin North Am* 30: 843-852, 2003.
- Guida M and Colucci G: Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma: is it a therapeutic option yet? *Ann Oncol* 18 (Suppl. 6): vi149-152, 2007.
- Lam JS, Shvarts O and Pantuck AJ: Changing concepts in the surgical management of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 45: 692-705, 2004.
- Lam JS, Pantuck AJ, Belldegrun AS and Figlin RA: Protein expression profiles in renal cell carcinoma: staging, prognosis, and patient selection for clinical trials. *Clin Cancer Res* 13: S703-S708, 2007.
- Moll R, Divo M and Langbein L: The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129: 705-733, 2008.
- Linder S: Cytokeratin markers come of age. *Tumour Biol* 28: 189-195, 2007.
- Oshima RG, Baribault H and Caulin C: Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18. *Cancer Metastasis Rev* 15: 445-471, 1996.
- Peinado H, Olmeda D and Cano A: Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev* 7: 415-428, 2007.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, *et al*: The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83, 2000.
- Becker KF, Rosivatz E, Blechschmidt K, Kremmer E, Sarbia M and Hofler H: Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers. *Cells Tissues Organs* 185: 204-212, 2007.
- Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, *et al*: Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21: 3241-3246, 2002.
- Davidson NE and Sukumar S: Of Snail, mice, and women. *Cancer Cell* 8: 173-174, 2005.
- Takahashi M, Yang XJ, Sugimura J, *et al*: Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. *Oncogene* 22: 6810-6818, 2003.
- Oosterwijk E, Ruiter DJ, Wakka JC, *et al*: Immunohistochemical analysis of monoclonal antibodies to renal antigens. Application in the diagnosis of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 123: 301-309, 1986.
- Finstad CL, Cordon-Cardo C, Bander NH, Whitmore WF, Melamed MR and Old LJ: Specificity analysis of mouse monoclonal antibodies defining cell surface antigens of human renal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2955-2959, 1985.
- Viey E, Fromont G, Escudier B, *et al*: Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* 174: 1338-1347, 2005.
- Noman MZ, Buart S, van Pelt J, *et al*: The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. *J Immunol* 182: 3510-3521, 2009.

20. Abouzahr-Rifai S, Hasmim M, Boukerche H, *et al.*: Resistance of tumor cells to cytolytic T lymphocytes involves Rho-GTPases and focal adhesion kinase activation. *J Biol Chem* 283: 31665-31672, 2008.
21. Hamai A, Meslin F, Benlalam H, *et al.*: ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res* 68: 9854-9864, 2008.
22. Asselin-Paturel C, Megherat S, Vergnon I, *et al.*: Differential effect of high doses versus low doses of interleukin-12 on the adoptive transfer of human specific cytotoxic T lymphocyte in autologous lung tumors engrafted into severe combined immunodeficiency disease-nonobese diabetic mice: relation with interleukin-10 induction. *Cancer* 91: 113-122, 2001.
23. Walter S, Bioley G, Buhring HJ, *et al.*: High frequencies of functionally impaired cytokeratin 18-specific CD8⁺ T cells in healthy HLA-A2⁺ donors. *Eur J Immunol* 35: 2876-2885, 2005.
24. Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, *et al.*: Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res* 62: 5818-5827, 2002.
25. Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, *et al.*: Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer* 6: 10, 2006.
26. Ohgami A, Mitsudomi T, Sugio K, *et al.*: Micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 64: 363-367, 1997.
27. Cintorino M, Tripod SA, Santopietro R, *et al.*: Cytokeratin expression patterns as an indicator of tumour progression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 21: 4195-4201, 2001.
28. Malzahn K, Mitze M, Thoenes M and Moll R: Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 433: 119-129, 1998.
29. Kakehashi A, Inoue M, Wei M, Fukushima S and Wanibuchi H: Cytokeratin 8/18 overexpression and complex formation as an indicator of GST-P positive foci transformation into hepatocellular carcinomas. *Toxicol Appl Pharmacol* 238: 71-79, 2009.
30. Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R and Pantel K: Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 2670-2674, 2004.
31. Moll R, Krepler R and Franke WW: Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation* 23: 256-269, 1983.
32. Moll R: Diversity of cytokeratins in carcinomas. *Acta Histochem* 34: 37-44, 1987.
33. Prochasson P, Gunther M, Laithier M, Fossar N, Lavalie C and Brison O: Transcriptional mechanisms responsible for the overexpression of the keratin 18 gene in cells of a human colon carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 248: 243-259, 1999.

Microenvironmental Hypoxia Orchestrating the Cell Stroma Cross Talk, Tumor Progression, and Antitumor Response

Muhammad Zaeem Noman,¹ Yosra Messai,¹ Thibault Carré,¹ Intissar Akalay,¹ Marine Méron,¹ Bassam Janji,² Meriem Hasmim,¹ & Salem Chouaib^{1,*}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 753, Villejuif, France, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ²Laboratory of Experimental Hemato-Oncology, Department of Oncology, Public Research Center for Health (CRP-Santé), L-1526 Luxembourg City, Luxembourg

*Address all correspondence to: Dr. Salem Chouaib, INSERM U753, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France; chouaib@igr.fr

ABSTRACT: Hypoxia, a common feature of solid tumors and one of the hallmarks of tumor microenvironment, favors tumor survival and progression. Although hypoxia has been reported to play a major role in the acquisition of tumor resistance to cell death, the molecular mechanisms that control the survival of hypoxic cancer cells and the role of hypoxic stress in shaping the cross talk between immune cells and stroma components are not fully elucidated. Recently, several lines of investigation are pointing to yet another ominous outcome of hypoxia in the tumor microenvironment involving suppression of antitumor immune effector cells and enhancement of tumor escape from immune surveillance. Although the identification of tumor-associated antigens provided a new arsenal of approaches to enhance antigen-specific response, the immunotherapy approaches that are currently used in the clinic have only limited success. In fact, tumor stroma components including hypoxia are engaged in an active molecular cross talk that has serious implications for immunological recognition of tumor in shaping the microenvironment. In this review, we will focus on the impact of hypoxia on the regulation of the antitumor response and the subsequent tumor progression. We will also in particular discuss data that indicate that manipulation of hypoxic stress may represent an innovative strategy for a better immunotherapy of cancer.

KEY WORDS: hypoxia, HIF-1 α , antitumor response and tumor progression

ABBREVIATIONS: **CSC:** cancer stem cells; **CTL:** cytotoxic T lymphocyte; **DC:** dendritic cell; **EMT:** epithelial to mesenchymal transition; **FIH-1:** factor inhibiting HIF-1; **HIF:** hypoxia inducible factor; **HRM:** hypoxia-regulated micro-RNA; **MDSC:** myeloid derived suppressive cell; **NF- κ B:** nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; **NK:** natural killer; **PHD2:** prolyl hydroxylase domain protein 2; **STAT-3:** signal transducer and activator of transcription-3; **TAM:** tumor-associated macrophage; **TGF- β :** transforming growth factor beta; **VHL:** von Hippel-Lindau tumor suppressor protein

I. INTRODUCTION

The term tumor hypoxia commonly refers to a condition in tumors where the oxygen pressure is less than 5–10 mm Hg.¹ Hypoxia is a common feature of almost all of the solid tumors and one of the hallmarks of tumor microenvironment.²

Solid tumors contain areas of variable oxygen concentrations. Tumor cells closest to a perfused

blood vessel have relatively high O₂ concentrations, which decline as distance from the vessel increases. There are areas that are well oxygenated, poorly oxygenated, and finally necrotic in which cancer cells have died due to inadequate oxygenation^{2,3} [Fig. 1(a)]. Accumulating evidence indicates that hypoxic zones in solid tumors have temporal fluctuations in oxygen concentration.⁴

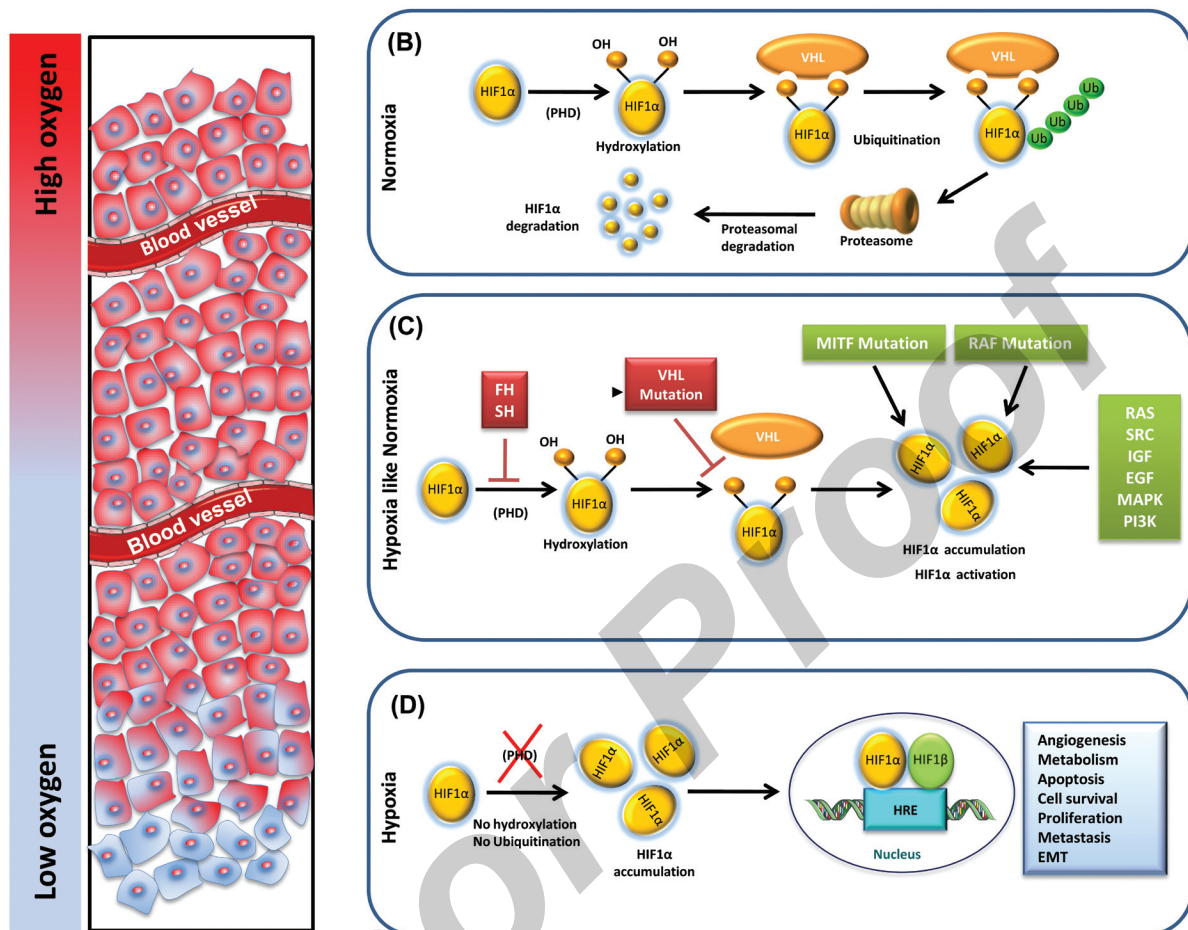


FIGURE 1. Schematic overview of normoxic and hypoxic regulation of HIF-1 α . (A) Solid tumors contain areas of variable oxygen concentrations. Tumor cells closest to a perfused blood vessel have relatively high O₂ concentrations (normoxic cells, highlighted in red). The O₂ concentrations decline as distance from the vessel increases (hypoxic cells, highlighted in blue). (B) In normoxia, HIF-1 α is hydroxylated by prolyl hydroxylases (PHDs), resulting in its interaction with the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL), which recruits an E3 ubiquitin-protein ligase that subsequently catalyzes polyubiquitination of HIF-1 α , thereby targeting it for proteasomal degradation. (C) Apart from strict oxygen-dependant regulation, HIF-1 α is also regulated by several oxygen-independent mechanisms (hypoxia such as normoxia). Mutations of fumarate hydratase (FH) and succinate hydratase (SH) inhibit the PHDs. VHL mutations lead to constitutive activation of HIFs. RAF and MITF mutations are able to regulate HIF-1 α under a normal level of O₂. (D) Under hypoxic conditions, hydroxylation is inhibited and HIF-1 α rapidly accumulates, dimerizes with HIF-1 β , and binds to the HREs (hypoxia response elements) in target genes. HIF-1 thereby controls several important processes in tumor biology.

A. Hypoxia Inducible Factors (HIFs) and Tumor Cell Adaptation to Hypoxia

Tumor cells adapt to hypoxic microenvironment by the regulation of hypoxia inducible factor family of transcription factors (HIFs). This family is composed

of three members, namely, HIF-1, HIF-2, and HIF-3. HIF-1 is a heterodimeric protein that is composed of a constitutively expressed HIF-1 β subunit and an O₂-regulated HIF-1 α subunit.⁵

HIF-1 α in the presence of O₂ is hydroxylated on proline residue 402 and/or 564 by prolyl

hydroxylase domain protein 2 (PHD2), resulting in its interaction with the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein, which recruits an E3 ubiquitin-protein ligase that eventually catalyzes polyubiquitination of HIF-1 α , thereby targeting it for proteosomal degradation⁶ [Fig. 1(b)]. Under hypoxic conditions, hydroxylation is inhibited and HIF-1 α rapidly accumulates, dimerizes with HIF-1 β , binds to the core DNA binding sequence 50-RCGTG-30 [R, purine (A or G)] in target genes, recruits coactivators, and activates transcription [Fig. 1(d)]. In addition, O₂-dependent hydroxylation of asparagine-803 by factor-inhibiting HIF-1 (FIH-1) blocks interaction of HIF-1 α with the coactivators P300/CBP under normoxic conditions.⁷ Both PHD2 and FIH-1 use O₂ and α -ketoglutarate as substrates and generate CO₂ and succinate as by-products of the hydroxylation reaction.⁸ Similar to HIF-1 α , HIF-2 α is also regulated by oxygen-dependent hydroxylation.⁹ HIF-1 α and HIF-2 α are structurally similar in DNA binding and dimerization domains but differ in their transactivation domains. Consistently, they share overlapping target genes, whereas each also regulates a set of unique targets.¹⁰ HIF-3 α lacks the transactivation domain and may function as an inhibitor of HIF-1 α and HIF-2 α and its expression is transcriptionally regulated by HIF-1.¹¹

Apart from strict oxygen-dependant regulation of HIFs, HIF-1 α and HIF-2 α are regulated by several oxygen-independent mechanisms.¹² It has been reported that mutation of VHL, PTEN, B-RAF, SDH, FH, and MITF are able to regulate HIF-1 α under normal level of O₂ (hypoxia like normoxia) [Fig. 1(c)]. This stability of HIF-1 α under normoxia leads to its increased transcriptional activity and may have a huge impact on cell biology and cancer development.

A large body of clinical data shows a positive correlation between increased hypoxic expression of HIF-1 α and HIF-2 α and patient mortality.⁸ Both HIF-1 α and HIF-2 α have common target genes as well as their respective target genes. The

genes induced by hypoxia-dependent HIF-1 α and HIF-2 α play important roles in regulating different aspects of tumor biology such as angiogenesis, cell survival, chemo- and radioresistance, proliferation, invasion and metastasis, pH regulation and metabolism, resistance to immune system, and maintenance of cancer stem cells.^{13,14}

Interestingly, HIF-1 α and HIF-2 α can have opposing effects on the cell cycle and on cell proliferation. The best example of this is clear cell renal carcinoma, in which HIF-2 α is described to drive the tumor growth while HIF-1 α may restrict proliferation.¹⁵ This opposite effect of HIF-1 α and HIF-2 α could be related to the mechanism involving the regulation of c-Myc. Indeed, it has been suggested that HIF-1 α antagonizes the activity of Myc while HIF-2 α enhances Myc activity.¹⁶

In this review, we will discuss how cells of the immune system (both innate and adaptive) respond to hypoxia in terms of their survival and effector functions. We will show the ways in which hypoxic tumor microenvironment promotes the recruitment, activation, and survival of innate immune cells while inhibiting the adaptive immunity. We will outline how hypoxic stress confers resistance to tumor cells, and describe the molecular aspects of the cross talk between hypoxia induced factors (HIF-1 α , p-stat3 and mir- [AQ: 1], etc.) and resistance to cytotoxic treatments. We will also illustrate the relationship between hypoxia and cancer stem cells. Finally, we will discuss whether the inhibition of hypoxic signaling pathways in different compartments of the solid tumor microenvironment will open new therapeutic opportunities in cancer immunotherapy.

II. HYPOXIA AFFECTING THE IMMUNE SYSTEM

The effects of hypoxia on immune cells are proposed to be critical factors for the development of tumor immune escape. The innate and adaptive immune systems respond differentially to decreased oxygen

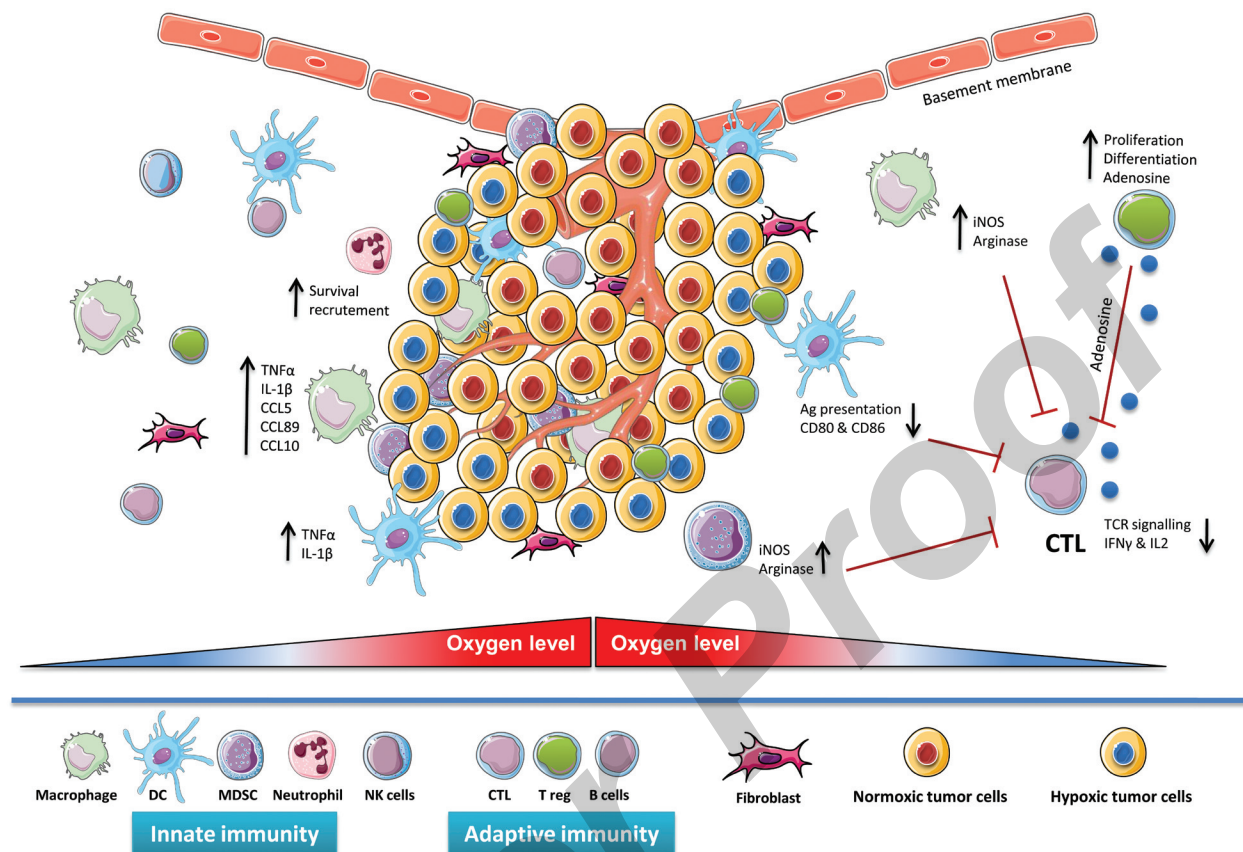


FIGURE 2. Influence of hypoxia on the innate and adaptive immune systems. Diverse effects of hypoxia on innate immune system (macrophage, DC, MDSC, NK, and neutrophil) and adaptive immune system (CTL, Treg, and B cells). In general, hypoxia amplifies the activity of innate immune cells while suppressing the response of the adaptive immune system. DC, dendritic cells; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; NK, natural killer cells; CTL, cytotoxic T lymphocyte; Treg, T regulatory cells.

levels with a global amplification of the innate responses and a direct or indirect (via the innate system) shortcoming of the adaptive ones. These diverse effects are summarized in Fig. 2.

A. Hypoxia Interferes with Innate Immunity

Hypoxia promotes neutrophils survival by inhibiting apoptosis and inducing the release of the neutrophil survival factor MIP-1 β .^{17,18} It also increases neutrophil blood vessel extravasation by modulating β integrin expression¹⁹ and neutrophil tumor infiltration through the secretion of

hypoxia-induced chemokines by hypoxic epithelial and endothelial cells.²⁰ Hypoxic zones in tumors are also able to attract macrophages leading to macrophage accumulation.²¹ The presence of HIF-1 α in tumor-associated macrophages suppresses cytotoxic T-cell function, and loss of HIF-1 α in macrophages is sufficient to relieve tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from immune suppression and decrease tumor growth.²² TAM and tumor-infiltrating neutrophils play a key role in cancer development and metastasis.^{23,24} TAM can also be issued from myeloid-derived suppressor cell (MDSC) differentiation following HIF1 α stabilization in MDSC within the hypoxic tumor

microenvironment. HIF-1 α in MDSC makes them able to suppress antigen-specific T-cell functions, which further supports the immunosuppressive environment observed within tumors.²⁵

The presence of HIF-1 α in dendritic cells (DCs) seems to have contradictory effects. Indeed, low oxygen levels are reported to inhibit DC maturation and differentiation but to enhance DC inflammatory functions. This leads to an inhibition of adaptive immune functions of DC but reinforcing their innate immune ones.²⁶ In contrast, other studies show that hypoxia induces human DC maturation and differentiation.^{27,28} These mature DCs overexpress HIF-1 α and their coculture with T cells induces T-cell maturation. These conflicting results could be explained by differences in the experimental approaches with regard to the source and purity of DC precursors, the protocols used for maturation and differentiation of DC, and the hypoxic stimulus (duration, level, hypoxic chambers versus CoCl₂). Future research is needed to further dissect the cross talk between hypoxia/HIFs [AQ: 2] and DCs, which represents a critical issue for our understanding of host responses to tumors.

B. Influence of Hypoxia on Adaptive Immunity

Hypoxia leads to the development of a proinflammatory microenvironment that promotes innate immunity while it inhibits adaptive immunity.¹⁸ Nonetheless, the role of hypoxia and HIFs on the adaptive immune system is not well characterized. It is reported that hypoxia promotes T-cell lymphocyte apoptosis.^{29,30} Other studies show on the contrary that hypoxia prevents T-cell activation-induced cell death resulting in increased survival.³¹ Deficiency for HIF-1 α in thymocytes from mice also results in increased caspase-8-mediated apoptosis.³² These conflicting results need to be reconciled. With regard to T-cell functions, hypoxia depresses CTL functions by inhibiting

TCR signaling.²⁹ It also induces increased local concentration of extracellular adenosine^{33,34} that acts on T-cell A2A adenosine receptors (A2AR) causing intracellular cAMP accumulation and subsequent inhibition of activated T cells. The use of A2AR antagonists or genetic depletion of A2AR weakens inhibition of antitumor T cells and inhibits or delays tumor growth.³⁵ These findings imply that hypoxia-mediated inhibition of T cells confers protection to the hypoxic tissue. Accordingly, in an inflammatory context, targeting of HIF-1 α in activated T cells is reported to increase T-cell responses suggesting that HIF-1 α , in addition to mediating physiological responses to hypoxia, also plays a negative regulatory role on T-cell functions.^{36,37} Recently, HIF-1 α has been shown to mediate Th17 differentiation and to inhibit regulatory T cells (Tregs) differentiation from naive T cells by activation of the glycolytic pathway.³⁸

With regard to B cell lymphocytes, HIF-1 α deficiency in chimeric mice causes lineage-specific defects in B-cell development with decreased proliferation of B-cell progenitors, appearance of abnormal B-cell population, and, similarly to the enhancement of T-cell functions in HIF-1 α -targeted T cells, autoimmune disorders.³⁹ In this context, it has been shown that HIF-1 α is required for efficient glycolysis in B cells in a stage-specific differentiation manner.⁴⁰ Thus, a potential role of HIF-1 α in autoimmunity has been proposed through the regulation of the development, metabolism, and functions of B cells.

III. IMPACT OF HYPOXIA ON TUMOR CELLS

A. Influence of Hypoxia-Induced Regulation of Tumor Cell Susceptibility to Cell-Mediated Cytotoxicity

It is now well established that hypoxic tumor microenvironment favors the emergence of tumor

variants with increased metastatic and invasive potential.⁴¹ Several other evidences suggest that HIF-1 α may have a protective role under hypoxic conditions.^{42,43} Since these tumor variants are resistant to radiotherapy and chemotherapy, one might postulate that the exposure to low levels of oxygen may lead to adaptive responses allowing tumor cells to escape from immune surveillance. Fink and colleagues reported the inhibition of natural killer (NK) cytotoxicity toward liver cell lines under hypoxic conditions.⁴⁴ **Siemens** et al. have recently reported that hypoxia contributes to tumor cell shedding of the MHC class I chain-related molecule (MIC) through a mechanism involving impaired nitric oxide (NO) signaling.⁴⁵ These findings suggest that hypoxia is able to confer tumoral cell resistance to effector cell cytotoxicity.

Recently, we have shown⁴⁶ that hypoxic exposure of target tumor cells inhibits the CTL clone-induced autologous target cell lysis. Interestingly, the observed lysis inhibition was not associated with an alteration of CTL reactivity and tumor cell recognition indicating that tumor-induced priming of the autologous CTL clone was not affected after exposure of tumor target cells to hypoxia. We further demonstrated that HIF-1 α induction and STAT3 activation are associated with hypoxia-induced lysis inhibition. Our results suggest a new role for hypoxia-dependent induction of HIF and activation of STAT3 in tumor resistance to the immune system.⁴⁶

B. Role of Hypoxia-Activated STAT3 in Modulating Antitumor Immune Response

STAT3 activation within tumor microenvironment is known to be associated with cytokine-induced proliferation, antiapoptosis, and transformation.^{47,48} Moreover, it is now well established that STAT3 modulates the cross talk between tumor and immune cells.⁴⁹ A novel small-molecule inhibitor of STAT3 has been reported to reverse immune

tolerance in malignant glioma patients.⁵⁰ Another inhibitor, sunitinib, was shown to positively change the immunosuppressive phenotype in RCC tumors,⁵¹ and more interestingly, Oza-Choy et al. have shown that sunitinib malate, a receptor tyrosine kinase inhibitor, could reverse MDSC-mediated immune suppression and modulate the tumor microenvironment by increasing higher percentage and infiltration of CD8 and CD4 cells, thereby improving the efficacy of immune-based therapies.⁵² This points to the potential role of STAT3 in tumor adaptation induced by hypoxia. The proposed role for STAT3 suggests that the effect of hypoxic induction of STAT3 extends beyond its critically important role in controlling cell survival and apoptosis. This emphasizes that a better understanding of the tumor behavior and its interplay with the killer cells in the context of the complexity and plasticity of a hypoxic microenvironment will be a critical determinant in a rational approach to tumor immunotherapy.

Although resistance of tumor targets to killer cells is likely to be regulated by multiple factors,⁵³ we believe that hypoxic microenvironment is a key determinant involved in the control of target sensitivity to CTL-mediated lysis. Therefore, the possibility that novel approaches targeting HIF-1 α and STAT3 with potent small-molecule drugs, being actively developed, may provide an exciting novel approach for cancer immunotherapy.

C. Role of Hypoxia-Induced Autophagy in the Adaptation of Tumor Cells to Anticancer Therapies

Autophagy is an evolutionarily conserved cellular process involving the formation of double-membrane vesicles called autophagosomes. These autophagosomes sequester organelles and cytoplasmic contents to deliver them to lysosomes for degradation.⁵⁴ The autophagic process allows cells to recycle damaged proteins and organelles to maintain nutrient and energy homeostasis during

sublethal stress including nutrient or growth factor deprivation, reactive oxygen species, and hypoxia.⁵⁵ It has been well documented that hypoxia activates the autophagy pathway in cancer cells [Fig. 3(a)]. The activation of autophagy under hypoxia depends on the induction of HIF-1 α , which activates the transcription of the BH3-only proteins *BNIP3* and *BNIP3L* leading to the disruption of the inhibitory interaction between Beclin 1 and Bcl-2 [Fig. 3(b)].^{56,57} In addition to *BNIP3* and *BNIP3L*, it has been reported that hypoxia, through the transcription factors ATF4 and CHOP, increases the transcription of *LC3* and *ATG5*,⁵⁸ two essential genes involved in the formation and maturation of autophagosomes. Several other pathways have been described to activate autophagy under hypoxia.⁵⁵ Autophagy has also recently been demonstrated as important for conferring resistance to different anticancer therapies including immunotherapy.⁵⁹ In several human cancer cell lines, hypoxia increased transcription of the essential autophagy genes such as *LC3*. This transcriptional induction replenished *LC3* protein that was turned over during extensive hypoxia-induced autophagy in order to maintain the autophagic process during hypoxia and thereby promotes the survival of cancer cells.⁵⁸ Consistent with these data, autophagy induction occurred preferentially in hypoxic regions of human tumor xenografts. Furthermore, pharmacological inhibition of autophagy sensitized human tumor cells to hypoxia, reduced the fraction of viable hypoxic tumor cells, and sensitized xenografted human tumors to anti-cancer therapy.⁵⁸ Collectively, these studies strongly argue that autophagy is an important mediator of the hypoxic tumor microenvironment and that it contributes to resistance to treatment. Beside its function as a protein degradation process, recent evidence points to a novel role of autophagy in innate and adaptive immunity.⁶⁰ Indeed, the autophagy pathway can modulate key steps in the development of adaptive immunity. In this context, it has been proposed that autophagy regulates the development and survival of lymphocytes as well as the modulation of antigen processing and presen-

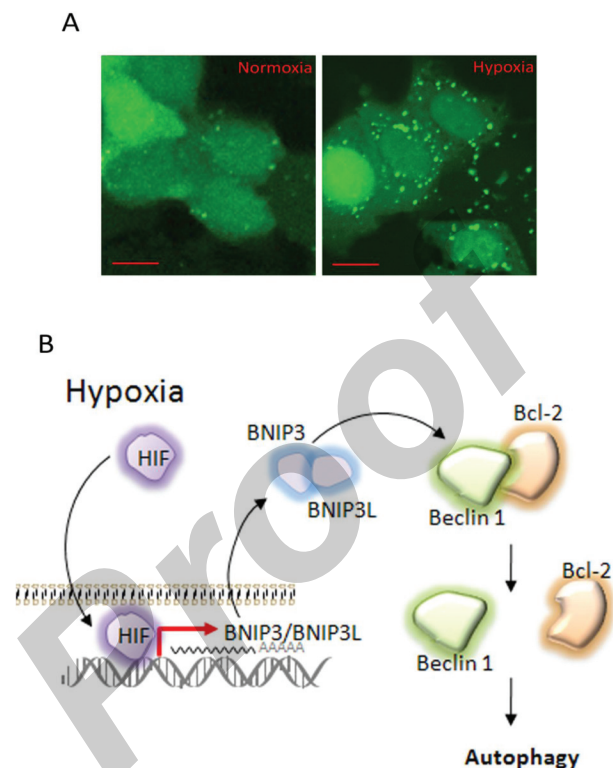


FIGURE 3. (A) Hypoxia induction of autophagy in MCF-7 breast adenocarcinoma cell line. Cells transfected with the autophagy marker *LC3* fused with GFP were cultured under normoxia (pO_2 21%) or hypoxia (pO_2 1%). The induction of autophagy was monitored by the formation of green dot-like structures corresponding to autophagosomes; bar, 10 μ m. (B) Involvement of HIF-1 α in the induction of autophagy. Under hypoxia, HIF-1 α activates the transcription of *BNIP3/BNIP3L* proteins. The overexpression of these proteins dissociates the autophagy inhibitory protein complex between Beclin 1 and Bcl-2, and consequently activates autophagy.

tation.⁶¹ Autophagy induction in target cells also increases their potential to serve as immunogens for dendritic cell cross-presentation to CD8⁺ T cells. Furthermore, the autophagy pathway can also modulate the selection and survival of some CD4⁺ T cells in the thymus.⁶² However, much still remains to be learned about the relationship between hypoxia-induced autophagy and the tumor immunotherapy. Obviously, targeting autophagy in hypoxic tumor cells may have a major impact on cancer immunotherapy.

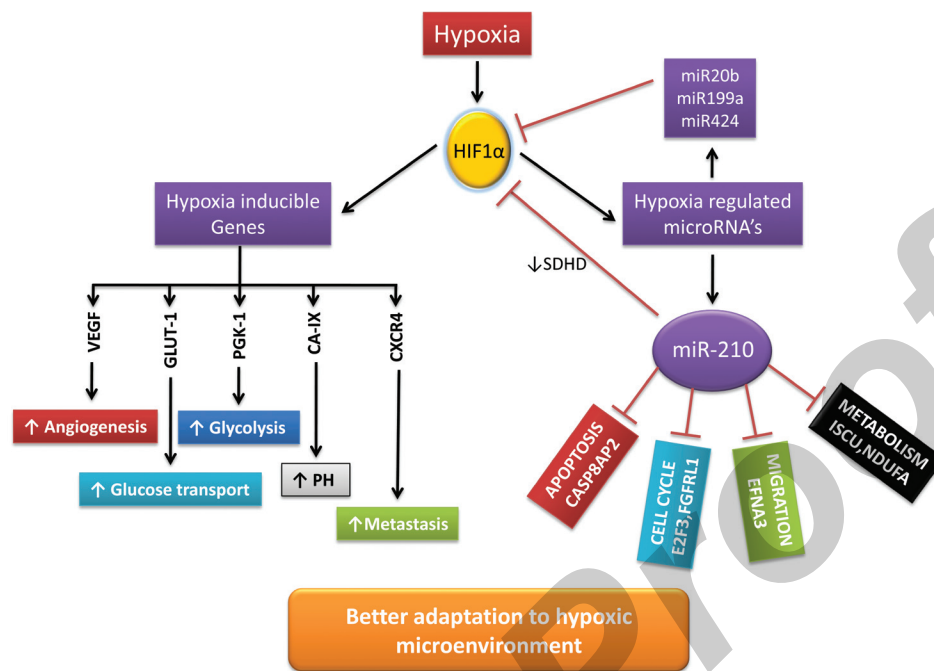


FIGURE 4. A proposed model of how hypoxia regulates hypoxia-inducible genes and hypoxia-regulated micro-RNAs (HRMs) leading to better adaptation to the hypoxic microenvironment. Hypoxia activates HIF-1 α , which in turn regulates the hypoxia-inducible genes (left side) such as VEGF, GLUT-1, PGK-1, CA-IX, and CXCR4. On the other hand, hypoxia regulates several micro-RNAs called hypoxia-regulated micro-RNAs (HRMs). Once induced, HRMs such as miR20b, miR199a, and miR424 affect HIF-1 α expression under hypoxia. One of the HRMs, miR-210, is able to repress several genes implicated in various physiopathological pathways.

D. Role of Hypoxia-Regulated Micro-RNAs in the Control of Tumor Behavior

Micro-RNAs (miRNAs) are about 18–24 nucleotides, and are small noncoding RNAs. They negatively regulate mRNA expression by repressing translation or directly cleaving the targeted mRNA.⁶³ Over the past few years, the role of miRNA has expanded from their functions in the development of roundworms to ubiquitous regulator implicated in several critical processes, including proliferation, cell death and differentiation, metabolism, and, importantly, tumorigenesis.⁶⁴

1. Hypoxia-Regulated Micro-RNAs (HRMs)

Hypoxia as an essential component of tumor microenvironment is capable of stabilizing tran-

scription factor HIF-1 α , which in turn is capable of regulating its target genes (classical pathway of response to hypoxia), but also much of micro-RNAs (new pathway of response to hypoxia). These micro-RNAs regulated by hypoxia are known as hypoxia-regulated micro-RNAs (HRMs) (Fig. 4). These HRMs are capable of repressing the expression of different target genes, thereby influencing important processes in tumor development such as angiogenesis, cell survival and cell death, etc.^{65,66} Recently, it has been shown that certain HRMs are capable of affecting HIF-1 α expression.⁶⁷

2. Mir-210: Mediator of Hypoxic Response

Among these HRMs, miR-210 is the only miRNA consistently upregulated in both normal and transformed hypoxic cells, and it is also generally

recognized as a robust HIF target.⁶⁸ Mir-210 has been considered as an *in vivo* marker of tumor hypoxia.⁶⁹ Mir-210 has been correlated positively to poor patient prognosis in head and neck cancers, and mir-210 has been detected in the serum of breast cancer patients.^{70–72} Mir-210 also participates in the hypoxic response of endothelial and neuronal cells.⁷³

More importantly, the increased expression of miR-210 also correlates with the improved survival of transplanted mesenchymal stem cells (MSCs) in a rat model. By downregulating caspase-8-associated protein 2 (CASP8-AP2), a proapoptotic regulator of Fas-mediated apoptosis,⁷⁴ miR-210 protects MSC from cell death. Finally, mir-210 is capable of regulating several cellular processes by regulating the expression of genes involved in angiogenesis, cell cycle, cell survival, and tumor initiation⁶⁸ (Fig. 4).

In summary, miR-210 plays a crucial role in mediating the cellular response to hypoxia resulting in a better adaptation of hypoxic cells to tumor microenvironment. Manipulating miR-210 within the tumor microenvironment may therefore lead to novel diagnostic and therapeutic approaches.

E. Hypoxia and Epithelial to Mesenchymal Transition

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a complex molecular process during which epithelial cells lose apico-basal polarity and acquire mesenchymal motile phenotype. A hallmark of the EMT is the downregulation of epithelial markers such as cadherin and cytokeratin, and the upregulation of mesenchymal markers such as vimentin leading to an organized disassembly of epithelial cell-cell contact.^{75–77} EMT has a central role in cancer progression and metastasis.^{78,79} Several signaling pathways (TGF B, Wnt, Notch, etc.) and transcriptional factors (Snail, Slug, Twist, etc.) can induce EMT.⁷⁹ Recently, hypoxic signaling through

HIF was implicated as an important trigger and modulator of EMT.^{80,81}

1. Hypoxic Regulation of EMT Triggering Signaling Pathways

Under hypoxic microenvironment, different signaling pathways, directly involved in triggering EMT, are activated⁸⁰ (Fig. 5). Members of TGF β are major inducers of EMT during embryonic development, fibrotic diseases, and cancer progression.⁸² TGF β , after binding to serine/threonine kinase receptors T β RI and II, recruits and phosphorylates TGF β cytoplasmic mediators SMADs. SMADs interact with EMT transcriptional factors (Snail, Slug, and SIP) and thereby inducing mesenchymal transition.⁸³ TGF β can also trigger EMT through cooperation with oncogenic pathways such as Ras, Wnt/ β catenin, and NF- κ B in order to maintain mesenchymal and invasive tumor cells' properties.⁸⁴ Several studies reported the existence of cooperation between hypoxia and TGF β in activating EMT. In fact, hypoxia induces an increase in TGF β production from mesenchymal and cancer cells.^{85,86} In hepatocytes, it was demonstrated that TGF- β signaling pathway is downstream of HIF activation and that hypoxia-induced EMT depends on TGF β signaling.⁸⁷ On the other hand, HIF-1 and TGF β co-regulate some gene targets such as the cyclooxygenase-2, which is implicated in enhancing EMT.⁸⁸

NF- κ B induces expression of the master EMT regulators Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, and Twist, which repress expression of genes encoding epithelial markers. NF- κ B also promotes a mesenchymal phenotype, migration, and invasion of tumor cells.⁸⁹ Different studies highlight the implication of hypoxia in the induction of EMT via the NF- κ B pathway most likely through cross talk between NF- κ B and HIF signaling pathways.⁹⁰ For example, it was demonstrated that inhibition of oxygen-dependent hydroxylases under hypoxia

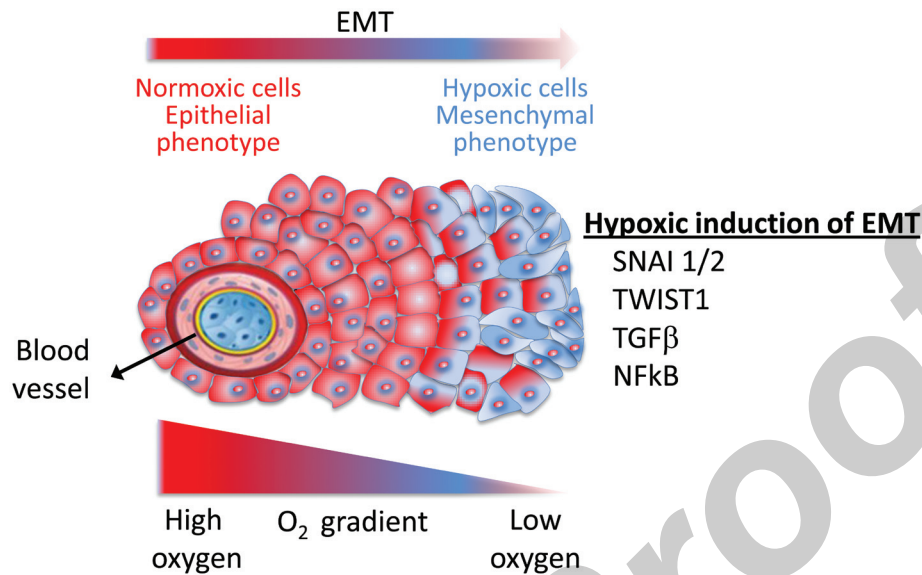


FIGURE 5. Schematic representation of the EMTs occurred under hypoxia. Cells located in the well oxygenated areas (normoxic areas) closest to blood vessel display an epithelial phenotype; however, cells located in poorly oxygenated areas lose their epithelial phenotype and gain mesenchymal properties following the activation of several transcription factors and pathways involved in the induction of the EMT.

leads to the activation of both HIF and NF-κB pathways.⁹¹

The Notch signaling pathway can induce EMT via increasing Snail expression or by interacting with TGF β/SMADs and NF-κB pathways.⁹² It has been shown that HIF-1 binds the Notch intracellular domain and stabilizes its transcriptional activity leading to the regulation of the Notch pathway under hypoxia.⁹³ Recent findings demonstrated that Notch pathway inhibition abrogated the hypoxia-mediated increase in Slug and Snail expression, as well as decreased breast cancer cell migration and invasion.⁹⁴

2. Hypoxic Regulation of EMT Transcription Factors

After hypoxia or constitutive HIF expression, epithelial cell lines regulate the expression of major EMT-associated transcription factors. Under hypoxic conditions, Twist [AQ: 3] protein level

is significantly upregulated in different tumor cell lines. Reduced endogenous HIF-1 reverted the Twist level in cells, indicating the key role of HIF in Twist expression regulation.⁹⁵ Twist overexpression induced in hypoxia conditions leads to repression of E-cadherin and promotes EMT and metastatic ability. Additionally, coexpression of Twist, Snail, and HIF-1α was recently correlated with bad prognosis and metastasis.^{96,97}

Snail, a zinc-finger transcription factor, is involved in the repression of many epithelial markers expression and plays a crucial role in carcinoma cells invasion. It has been associated with decreased recurrence-free survival.⁹⁸ Increased Snail expression, under hypoxia, accompanied by decreased E-cadherin expression, has been reported in ovarian cancer cell lines.⁹⁹ Exposure of human breast cell lines to hypoxia also induced EMT with elevated Snail and vimentin expression.¹⁰⁰ Additionally, some hypoxia targets [lysyl oxidase like 2, urokinase plasminogen activator (uPA) and its receptor [AQ: 4]] could regulate Snail and

trigger EMT.^{101,102} Recently, Luo et al. identified a hypoxia-responsive element within close proximity of the minimal Snail promoter, which binds both HIF-1 and HIF-2 target genes and activates Snail transcription.¹⁰³ Hypoxia can also increase the expression of epithelial repressor Slug via HIF-1 α promoting cancer cells invasiveness. Recently, Chen et al. reported that induced Slug and Snail expression by hypoxia-mediated Notch signaling is associated with increased breast cancer cell migration and invasion.⁹⁴

Thus, it is well established that hypoxia-regulated EMT is directly implicated in tumor growth, invasion, and metastasis. In the future, we have to consider targeting both hypoxia and EMT in the design of new drugs.

F. Hypoxia and Cancer Stem Cells

Tumor growth is dependent on the presence of a subpopulation with stemlike properties called cancer stem cells (CSCs) within the tumor.¹⁰⁴ CSCs, which are in an undifferentiated state, undergo self-renewal and when implanted in immune-deficient mice are able to develop tumors and to reestablish the bulk tumoral heterogeneity.¹⁰⁵ CSCs also have the property to resist conventional antitumor therapies,¹⁰⁶ which makes them a probable cause of tumor recurrences after treatment. Therefore, their eradication in the tumor is a therapeutic challenge that justifies a better understanding of their emergence and persistence in the tumoral tissue.

In this regard, hypoxia and HIFs have been described to induce tumor cell dedifferentiation toward an immature phenotype and similarly to maintain tumor cells with stem cell properties.¹³ Several reports show the role of hypoxia and HIFs in promoting a stemlike phenotype through the expression of genes such as OCT4, SOX2, and NANOG required for self-renewal maintenance in stem cells or the activation of the Notch signaling pathway that regulate cell self-renewal and differentiation.¹³ A study from Jogi et al. has shown that

culturing neuroblastoma cells under hypoxia led to an increase of neural crest gene expression and a decrease of neuron lineage marker expression.¹⁰⁷ In glioblastoma, Mc Cord et al. have reported that glioblastoma neurospheres under hypoxia show an increased proportion of CD133⁺ stemlike cells and induction of embryonic markers such as OCT4 and SOX2. This was associated with a selective increase of HIF-2 α .¹⁰⁸ Hypoxia was reported by Chen et al. to activate Notch signaling pathway in lung adenocarcinoma, which revealed to be essential since using a Notch signaling inhibitor under hypoxia induced cell death.¹⁰⁹ However, Notch pathway can also promotes cell differentiation in keratinocytes and certain neural stem cells.^{110,111} This ability of hypoxia to increase the stem cell-like subset inside a tumor cell population reflects the plasticity of the CSC compartment and the role of microenvironmental stimuli in shaping this particular subset.

Some of the effects of hypoxia on tumor cell differentiation are directly mediated by the HIFs. Li et al. reported that targeting HIF-1 α and HIF-2 α in CD133⁺ glioma stem cells decreased their survival and their tumorigenic and angiogenic potentials.¹¹² They also reported a preferential expression of HIF-2 α in CD133⁺ glioma stem cells, whereas HIF-1 α was present in both stem and nonstem tumor cells and needed more severe hypoxia to be stabilized. Another study using human neuroblastoma cells also found a selective expression of HIF-2 α in an immature cell subset, with induction of differentiation when targeting HIF-2 α .¹¹³ Overexpression of HIF-2 α in non-glioma stem cells was sufficient to induce a stem cell-like phenotype (sphere-forming ability, larger tumors after mice engraftment).¹¹⁴ At a clinical level, HIF-2 α expression in patients correlated with poorer prognosis.^{112,113} These findings support a preferential targeting of HIF-2 α for selective eradication of CSCs without adverse effects on normal progenitor cells. HIF-1 α is not outdone since a recent study by Wang et al. using human leukemia showed a selective activation of HIF-1 α

in CSCs under normoxic conditions due to VHL deficiency, and that blocking HIF-1 α activity was able to eliminate leukemia stem cells without affecting the normal hematopoietic stem cells.¹¹⁵

These studies and others describe the effects of hypoxia in converting differentiated cancer cells into stemlike cancer cells, and the possibility that stabilized HIF-1 α or HIF-2 α may represent critical targets for eradicating the tumoral stem cell compartment. Thereby, HIF protein functions in tumors go beyond mediating adaptation to hypoxia by modulating cell metabolism and survival and driving vessel development. Intriguingly, CSCs were proposed to localize more within a tumor and hypoxic niches than in perivascular and consequently oxygenated regions. In this regard, it has been proposed that both hypoxic and nonhypoxic mechanisms of CSC regulation [AQ: 5], although this hypothesis remain to be investigated.¹¹⁶

G. Hypoxia-like Normoxia: Oxygen-Independent Regulation of HIF1 α and HIF2 α

Apart from oxygen-dependent strict regulation of HIFs, HIF1 α and HIF2 α can also be regulated by oxygen-independent mechanisms, leading to increased HIF transcriptional program under normal level of O₂ and promoting tumor growth.⁸ Here, we will discuss how genetic alterations such as gain of function mutations of oncogene or loss of function of tumor suppressor gene can be responsible for overexpression of HIFs in a cell type-specific manner. Recently, it has been shown that inducers of HIF α such as reactive oxygen⁴ and nitrogen species¹¹⁷ can also be found in the microenvironment.

1. Constitutive HIF Activation through Inactivation of VHL Gene

A constitutive HIF gene activation can be observed in VHL diseases (renal cell carcinomas patients

and most of sporadic clear cell RCCs) characterized by an inactivation of VHL gene. The double allele loss of function (deletion, mutation, CpG island hypermethylation) VHL^{-/-} gives rise to an increased level of HIF-1 α and HIF-2 α ^{118,119} or only of HIF-2 α , which seems to be necessary and sufficient for tumor growth in VHL^{-/-} RCC cell lines contrary to HIF1 α .^{119,120}

2. Constitutive HIF Activation by RAS/RAF/MITF Overactivation

Activating mutation of RAS¹²¹ and RAF¹²² were also linked to enhanced levels of HIF α protein, even in normoxic conditions. In colon cancer, it was described that RAS and RAF mutation enable a better response of cancer cells to hypoxia. This underlines their differential impact on HIF1 α or HIF2 α and justifies phenotypic differences in KRAS or BRAF colon cancer.¹²³ Furthermore, in melanoma cells, mutant BRAF can enhance HIF1 α expression in normoxia¹²⁴ and is also described as a regulator of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) through a “tricky” process implying an increase in ERK-induced MITF degradation in parallel with an increase of MITF transcription by BRN2.¹²⁵ MITF is itself described as a transcriptional activator of HIF1 α in melanoma.¹²⁶

3. Constitutive HIF Activation through Inactivation of Fumarate and Succinate Hydratase Gene

Inactivation by germ line mutations of fumarate and succinate hydratase genes in renal cancer cell predisposes to hereditary leiomyomatosis syndrome (HLRCC) and induces hereditary paraganglioma syndrome, respectively. It has been shown that accumulation of fumarate or succinate is accompanied by a high level of HIF under normoxia. This accumulation seems to be mediated by an inhibition of PHD.^{127,128}

4. Growth Factor, Oncogenic Signaling Pathways, and Increase of HIF Level

HIF1 α levels can be increased by growth factor stimulation. It is noteworthy that a hypoxia-dependent increase of HIF-1 α in cell-type specific is not due to its reduced degradation, as observed under hypoxia, but rather to a stimulation of HIF1 α synthesis through oncogenic signaling pathways.¹² For example, insulin, insulinlike growth factor, epidermal growth factor, and fibroblast growth factor can induce expression of HIF-1 α in normoxia via mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt pathways.¹²⁹ It is interesting to note that the Akt pathway can be overactivated in cells displaying either a loss of function of PTEN¹³⁰ or an overexpression of HER2.¹³¹

5. Constitutive HIF Activation by Src Overactivation

Hyperactivity of Src can be responsible for a high level of HIF-1 α under normoxia. The high level of HIF-1 α in cells displaying activated Src is related to the production of ROS, which reduces cellular vitamin C required for the activity of PHD2. A defect of PHD2 activation leads to HIF-1 α accumulation by preventing its hydroxylation-dependent ubiquitinylation.¹³²

Overall, constitutively active HIF-1 α and HIF-2 α play a major role in cancer by inducing adaptation of tumor cell to hypoxia microenvironment. However, activated HIFs in normoxic cells seems to be cell specific.¹²

IV. DOES TARGETING OF HYPOXIA RESULT IN A MORE EFFICIENT IMMUNOTHERAPY?

Clinical vaccination trials aimed at triggering or enhancing antitumor immunity are at present disappointing, given the different mechanisms of tumor escape from immunosurveillance that

represent the last series of hurdles to be overcome in formulating truly effective cancer immunotherapy.^{133,134} Clearly, tumor-induced alterations to the patient's immune system may subvert anticancer responses and even promote tumor growth. To provide a significant clinical advancement, new concepts have to be introduced to aid the design of new tools for therapy. In addition, there are increasing indications that tumor stroma components including hypoxia play a crucial role in the control of immune protection and contain many overlapping mechanisms to maintain tumor functional disorder and evasion of antigenic-specific immunotherapy. Therefore, in parallel to the efforts oriented toward the identification of potential candidate antigens for vaccination, closer attention should be paid to the complexity of the tumor ecosystem in deviating the functions of tumor infiltrating cells. It seems obvious that more could be achieved by combining therapies that tackle malignancies from multiple angles, with the tumor microenvironment conditioned to support a powerful effector arm generated by immunotherapy. Tumor immunotherapy in the clinic has not taken it into account the hypoxic microenvironment and its impact on the therapeutic outcome. Because the hypoxia-inducible factor (HIF) was recently shown to regulate the tumorigenic capacity of tumor and cancer stem cells under hypoxic conditions,¹¹² further investigation is required to demonstrate if HIF-1 is prevalent enough in human cancer to be a general target. One of the challenges of cancer immunotherapy is how to design combination therapies that modify the hypoxic tumor microenvironment so as to promote immunity and better design more adapted immunotherapy approaches. Whether the suppression of HIF-1 α expression may be a promising strategy that is selective for facilitating immunotherapeutic efficacy in cancer patients is at present under investigation.

V. CONCLUSIONS

The growth and spread of cancer depends as much on the host response to tumor as on the biological characteristics of the tumor itself. This interaction is at its most intimate and dynamic within the tumor microenvironment. The role of the latter during the initiation and progression of carcinogenesis is now realized to be of critical importance for both enhanced understanding of fundamental cancer immunology and biology and exploiting this source of relatively new knowledge for improved molecular diagnostics, therapeutics, and immune intervention. It has become clear now that tumor stroma components including hypoxia are engaged in an active molecular cross talk that has serious implications for immunological recognition of tumor in shaping the microenvironment. Indeed, hypoxia incapacitates several different types of immune effector cells, enhances the activity of immunosuppressive cells, and provides new avenues that help “blind” immune cells to detect the presence of tumor cells. Obviously, understanding the tumor microenvironment and its targeting to awaken or reawaken immune cells, or to redirect it from a protumor to an antitumor state, will help to instruct clinical immunotherapy.

ACKNOWLEDGMENTS

A part of the work reviewed in this article was supported by the ARC/INCA, Ligue de Recherche contre le Cancer, ARC, ANR, Cancéropole Ile-de-France, Cancéropole Grand Ouest, and INCA/CNRS.

REFERENCES [AQ: 6]

1. Semenza GL. Hif-1 inhibitors for cancer therapy: from gene expression to drug discovery. *Curr Pharm Des.* 2009;15(33):3839–43.
2. Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):38–47.
3. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med.* 2007 Dec;85(12):1301–7.
4. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer.* 2008 Jun;8(6):425–37.
5. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-Pas heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5510–4.
6. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (Hif-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 1997 Sep 5;272(36):22642–7.
7. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the Hif transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 2002 Feb 1;295(5556):858–61.
8. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 2010 Feb 4;29(5):625–34.
9. Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2 α in development and disease. *Cell Death Differ.* 2008 Apr;15(4):628–34.
10. Lau KW, Tian YM, Raval RR, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Target Gene Selectivity of hypoxia-inducible factor- α in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *Br J Cancer.* 2007 Apr 23;96(8):1284–92.
11. Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, Morimoto C. transcriptional up-regulation of inhibitory Pas domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (Hif-1): a negative feedback regulatory circuit in Hif-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem.* 2007 May 11;282(19):14073–82.
12. Semenza GL. Targeting Hif-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):721–32.
13. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell.* 2007 May 4;129(3):465–72.

14. Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Jun;26(2):273–9.
15. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. Hif-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing C-Myc transcriptional activity. *Cancer Cell.* 2007 Apr;11(4):335–47.
16. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. Hif and C-Myc: Sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell.* 2007 Aug;12(2):108–13.
17. Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, Chilvers ER. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by Hif-1alpha-dependent Nf-Kappab activity. *J Exp Med.* 2005 Jan 3;201(1):105–15.
18. Sica A, Melillo G, Varesio L. Hypoxia: a double-edged sword of immunity. *J Mol Med.* 2011 Jul;89(7):657–65.
19. Imtiyaz HZ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;345:105–20.
20. Rinaldo JE, Basford RE. Neutrophil-endothelial interactions: modulation of neutrophil activation responses by endothelial cells. *Tissue Cell.* 1987;19(5):599–606.
21. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol.* 2000 Oct;192(2):150–8.
22. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, Coussens LM, Karin M, Goldrath AW, Johnson RS. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res.* 2010 Oct 1;70(19):7465–75.
23. Almholt K, Johnsen M. Stromal Cell involvement in cancer. recent results. *Cancer Res.* 2003;162:31–42.
24. Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type ii polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer.* 2004 Jul;40(11):1660–7.
25. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, Cho HI, Celis E, Quiceno DG, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Gabrilovich DI. Hif-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med.* 2010 Oct 25;207(11):2439–53.
26. Mancino A, Schioppa T, Larghi P, Pasqualini F, Nebuloni M, Chen IH, Sozzani S, Austyn JM, Mantovani A, Sica A. Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood.* 2008 Nov 1;112(9):3723–34.
27. Rama I, Bruene B, Torras J, Koehl R, Cruzado JM, Bestard O, Franquesa M, Lloberas N, Weigert A, Herrero-Fresneda I, Gullias O, Grinyo JM. Hypoxia stimulus: an adaptive immune response during dendritic cell maturation. *Kidney Int.* 2008 Apr;73(7):816–25.
28. Jantsch J, Chakravorty D, Turza N, Prechtel AT, Buchholz B, Gerlach RG, Volke M, Glasner J, Warnecke C, Wiesener MS, Eckardt KU, Steinkasserer A, Hensel M, Willam C. Hypoxia and Hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):4697–705.
29. Sun J, Zhang Y, Yang M, Xie Q, Li Z, Dong Z, Yang Y, Deng B, Feng A, Hu W, Mao H, Qu X. Hypoxia induces T-cell apoptosis by inhibiting chemokine C receptor 7 expression: the role of adenosine receptor a(2). *Cell Mol Immunol.* 2010 Jan;7(1):77–82.
30. Carraro F, Pucci A, Pellegrini M, Pelicci PG, Baldari CT, Naldini A. P66shc is involved in promoting hif-1alpha accumulation and cell death in hypoxic T cells. *J Cell Physiol.* 2007 May;211(2):439–47.
31. Makino Y, Nakamura H, Ikeda E, Ohnuma K, Yamauchi K, Yabe Y, Poellinger L, Okada Y, Morimoto C, Tanaka H. Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6534–40.
32. Biju MP, Neumann AK, Bensinger SJ, Johnson RS, Turka LA, Haase VH. Vhlh Gene deletion

- induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes. *Mol Cell Biol.* 2004 Oct;24(20):9038–47.
33. Van Belle H, Goossens F, Wynants J. Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. *Am J Physiol.* 1987 May;252(5 Pt 2):H886–93.
 34. Winn HR, Rubio GR, Berne RM. The role of adenosine in the regulation of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981;1(3):239–44.
 35. Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 1;14(19):5947–52.
 36. Lukashev D, Klebanov B, Kojima H, Grinberg A, Ohta A, Berenfeld L, Wenger RH, Sitkovsky M. Cutting Edge: Hypoxia-inducible factor 1alpha and its activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of Cd4+ and Cd8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2006 Oct 15;177(8):4962–5.
 37. Thiel M, Caldwell CC, Kreth S, Kuboki S, Chen P, Smith P, Ohta A, Lentsch AB, Lukashev D, Sitkovsky MV. Targeted deletion of Hif-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. *PLoS One.* 2007;2(9):e853.
 38. Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, Chi H. Hif1{alpha}-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of Th17 and Treg cells. *J Exp Med.* 2011 Jul 4;208(7):1367–76.
 39. Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, Semenza GL, Sitkovsky MV. Abnormal B Lymphocyte Development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha-deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19;99(4):2170–4.
 40. Kojima H, Kobayashi A, Sakurai D, Kanno Y, Hase H, Takahashi R, Totsuka Y, Semenza GL, Sitkovsky MV, Kobata T. Differentiation stage-specific requirement in hypoxia-inducible factor-1alpha-regulated glycolytic pathway during murine B cell development in bone marrow. *J Immunol.* 2010 Jan 1;184(1):154–63.
 41. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Jun;26(2):319–31.
 42. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (Hif-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res.* 2000 May-Jun;20(3A):1527–33.
 43. Liu XH, Yu EZ, Li YY, Kagan E. Hif-1alpha has an anti-apoptotic effect in human airway epithelium that is mediated via Mcl-1 gene expression. *J Cell Biochem.* 2006 Mar 1;97(4):755–65.
 44. Fink T, Ebbesen P, Koppelhus U, Zachar V. Natural Killer cell-mediated basal and interferon-enhanced cytotoxicity against liver cancer cells is significantly impaired under in vivo oxygen conditions. *Scand J Immunol.* 2003 Dec;58(6):607–12.
 45. Siemens DR, Hu N, Sheikhi AK, Chung E, Frederiksen LJ, Pross H, Graham CH. Hypoxia increases tumor cell shedding of Mhc class I chain-related molecule: role of nitric oxide. *Cancer Res.* 2008 Jun 15;68(12):4746–53.
 46. Noman MZ, Buart S, Van Pelt J, Richon C, Hasmim M, Leleu N, Suchorska WM, Jalil A, Lecluse Y, El Hage F, Giuliani M, Pichon C, Azzarone B, Mazure N, Romero P, Mami-Chouaib F, Chouaib S. The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and stat3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to Ctl-mediated cell lysis. *J Immunol.* 2009 Mar 15;182(6):3510–21.
 47. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 1999 Aug 6;98(3):295–303.
 48. Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. Stat proteins as novel targets for cancer therapy. signal transducer an activator of transcription. *Curr Opin Oncol.* 1999 Nov;11(6):490–6.
 49. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med.* 2004 Jan;10(1):48–54.

50. Hussain SF, Kong LY, Jordan J, Conrad C, Madden T, Fokt I, Priebe W, Heimberger AB. A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients. *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):9630–6.
51. Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2506–13.
52. Ozaio-Choy J, Ma G, Kao J, Wang GX, Meseck M, Sung M, Schwartz M, Divino CM, Pan PY, Chen SH. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2514–22.
53. Chouaib S. Integrating the quality of the cytotoxic response and tumor susceptibility into the design of protective vaccines in tumor immunotherapy. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(5):595–7.
54. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Apr;22(2):124–31.
55. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2):280–93.
56. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of Bnip3 and Bnip3l via their Bh3 domains. *Mol Cell Biol.* 2009 May;29(10):2570–81.
57. Mazure NM, Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Apr;22(2):177–80.
58. Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M, Wouters BG. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes Map1lc3b and Atg5. *J Clin Invest.* 2010 Jan 4;120(1):127–41.
59. Livesey KM, Tang D, Zeh HJ, Lotze MT. Autophagy inhibition in combination cancer treatment. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009 Dec;10(12):1269–79.
60. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):323–35.
61. Chemali M, Radtke K, Desjardins M, English L. Alternative pathways for Mhc class I presentation: a new function for autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2011 May;68(9):1533–41.
62. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology.* 2010 Sep;131(1):9–17.
63. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene Lin-14 by Lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):855–62.
64. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development.* 2005 Nov;132(21):4653–62.
65. Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M. A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ.* 2008 Apr;15(4):667–71.
66. Kulshreshtha R, Ferracin M, Negrini M, Calin GA, Davuluri RV, Ivan M. Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. *Cell Cycle.* 2007 Jun 15;6(12):1426–31.
67. Loscalzo J. The cellular response to hypoxia: tuning the system with microRNAs. *J Clin Invest.* 2010 Nov 1;120(11):3815–7.
68. Devlin C, Greco S, Martelli F, Ivan M. Mir-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB Life.* 2011 Feb;63(2):94–100.
69. Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, Story M, Le QT, Giaccia AJ. Hypoxia-inducible Mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell.* 2009 Sep 24;35(6):856–67.
70. Gee HE, Camps C, Buffa FM, Patiar S, Winter SC, Betts G, Homer J, Corbridge R, Cox G, West CM, Ragoussis J, Harris AL. Hsa-Mir-210 Is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer.* 2010 May 1;116(9):2148–58.

71. Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadow JM, Ragoussis J. Hsa-Mir-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1340–8.
72. Huang X, Le QT, Giaccia AJ. Mir-210—micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med.* 2010 May;16(5):230–7.
73. Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Yla-Herttuala S. Hypoxia induces microRNA Mir-210 in vitro and in vivo Ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by Mir-210. *FEBS Lett.* 2008 Jul 9;582(16):2397–401.
74. Kim HW, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via Mir-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. *J Biol Chem.* 2009 Nov 27;284(48):33161–8.
75. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun;2(6):442–54.
76. Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Raaka BM. Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science.* 2004 Dec 24;306(5705):2261–4.
77. Meulemans D, Bronner-Fraser M. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell.* 2004 Sep;7(3):291–9.
78. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 2005 Jul;132(14):3151–61.
79. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb;7(2):131–42.
80. Jiang J, Tang YL, Liang XH. EMT: A new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol Ther.* 2011 Apr 15;11(8):714–23.
81. Sleeman JP, Thiery JP. Snapshot: the epithelial-mesenchymal transition. *cell.* 2011 Apr 1;145(1):162 e1.
82. Asiedu MK, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL. Tgf{Beta}/Tnf{Alpha}-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a Claudin-low phenotype. *Cancer Res.* 2011 Jul 1;71(13):4707–19.
83. Zavadil J, Bottinger EP. Tgf-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene.* 2005 Aug 29;24(37):5764–74.
84. Neth P, Ries C, Karow M, Egea V, Ilmer M, Jochum M. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev.* 2007 Jan;3(1):18–29.
85. Nishi H, Nakada T, Hokamura M, Osakabe Y, Itokazu O, Huang LE, Isaka K. Hypoxia-inducible factor-1 transactivates transforming growth factor-beta3 in trophoblast. *Endocrinology.* 2004 Sep;145(9):4113–8.
86. Schaffer L, Scheid A, Spielmann P, Breymann C, Zimmermann R, Meuli M, Gassmann M, Marti HH, Wenger RH. Oxygen-regulated expression of Tgf-Beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta.* 2003 Nov;24(10):941–50.
87. Copple BL. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int.* 2010 May;30(5):669–82.
88. Lee JD, Hempel N, Lee NY, Blobe GC. The type III Tgf-beta receptor suppresses breast cancer progression through Gipc-mediated inhibition of Tgf-beta signaling. *Carcinogenesis.* 2010 Feb;31(2):175–83.
89. Maier HJ, Schmidt-Strassburger U, Huber MA, Wiedemann EM, Beug H, Wirth T. Nf-Kappab promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2010 Sep 28;295(2):214–28.
90. Taylor CT, Cummins EP. The role of Nf-Kappab in hypoxia-induced gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Oct;1177:178–84.
91. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates Ikappab kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced Nfkappab activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 28;103(48):18154–9.

92. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottinger EP. Integration of Tgf-Beta/Smad and Jagged1/notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *Embo J*. 2004 Mar 10;23(5):1155–65.
93. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 2005 Nov;9(5):617–28.
94. Chen J, Imanaka N, Chen J, Griffin JD. Hypoxia potentiates notch signaling in breast cancer leading to decreased E-Cadherin expression and increased cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 2010 Jan 19;102(2):351–60.
95. Sun S, Ning X, Zhang Y, Lu Y, Nie Y, Han S, Liu L, Du R, Xia L, He L, Fan D. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int*. 2009 Jun;75(12):1278–87.
96. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ. Direct regulation of twist by Hif-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol*. 2008 Mar;10(3):295–305.
97. Liang X, Zheng M, Jiang J, Zhu G, Yang J, Tang Y. Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with Twist2 and Snip1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2010 Feb;47(2):92–7.
98. Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD, Chodosh LA. The transcriptional repressor snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell*. 2005 Sep;8(3):197–209.
99. Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, Konishi I. Hypoxia attenuates the expression of E-Cadherin via up-regulation of snail in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol*. 2003 Oct;163(4):1437–47.
100. Lundgren K, Nordenskjold B, Landberg G. Hypoxia, snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Br J Cancer*. 2009 Nov 17;101(10):1769–81.
101. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*. 2006 Apr 27;440(7088):1222–6.
102. Gupta R, Chetty C, Bhoopathi P, Lakka S, Mohanam S, Rao JS, Dinh DE. Downregulation of Upa/Upar inhibits intermittent hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (Emt) in Daoy and D283 medulloblastoma cells. *Int J Oncol*. 2011 Mar;38(3):733–44.
103. Luo D, Wang J, Li J, Post M. Mouse snail is a target gene for Hif. *Mol Cancer Res*. 2011 Feb;9(2):234–45.
104. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105–11.
105. Pardo R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec;3(12):895–902.
106. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008 Oct;8(10):755–68.
107. Jogi A, Ora I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelson H, Pahlman S. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):7021–6.
108. McCord AM, Jamal M, Shankavaram UT, Lang FF, Camphausen K, Tofilon PJ. Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of Cd133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol Cancer Res*. 2009 Apr;7(4):489–97.
109. Chen Y, De Marco MA, Graziani I, Gazdar AF, Strack PR, Miele L, Bocchetta M. Oxygen concentration determines the biological effects of notch-1 signaling in adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res*. 2007 Sep 1;67(17):7954–9.
110. Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ. Transient notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell*. 2000 May 26;101(5):499–510.
111. Wilson A, Radtke F. Multiple functions of notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Lett*. 2006 May 22;580(12):2860–8.

112. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009 Jun 2;15(6):501–13.
113. Pietras A, Gisselsson D, Ora I, Noguera R, Beckman S, Navarro S, Pahlman S. High levels of Hif-2alpha highlight an immature neural crest-like neuroblastoma cell cohort located in a perivascular niche. *J Pathol*. 2008 Mar;214(4):482–8.
114. Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*. 2009 Oct 15;8(20):3274–84.
115. Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P, Liu Y. Targeting Hif1alpha eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell*. 2011 Apr 8;8(4):399–411.
116. Bar EE. Glioblastoma, cancer stem cells and hypoxia. *Brain Pathol*. 2011 Mar;21(2):119–29.
117. Quintero M, Brennan PA, Thomas GJ, Moncada S. Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):770–4.
118. Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, van Engeland M, de Bruine AP. Vhl and Hif signalling in renal cell carcinogenesis. *J Pathol*. 2010 Jun;221(2):125–38.
119. Li M, Kim WY. Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *J Cell Mol Med*. 2011;15:187–95.
120. Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of Hif2alpha is sufficient to suppress Pvh1-defective tumor growth. *PLoS Biol*. 2003 Dec;1(3):e83.
121. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of Glut1 Mrna by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-Ras and hypoxia. *J Biol Chem*. 2001 Mar 23;276(12):9519–25.
122. Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):40112–7.
123. Kikuchi H, Pino MS, Zeng M, Shirasawa S, Chung DC. Oncogenic Kras and Braf differentially regulate hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in colon cancer. *Cancer Res*. 2009 Nov 1;69(21):8499–506.
124. Kumar SM, Yu H, Edwards R, Chen L, Kazianis S, Brafford P, Acs G, Herlyn M, Xu X. Mutant V600e Braf increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. *Cancer Res*. 2007 Apr 1;67(7):3177–84.
125. Wellbrock C, Rana S, Paterson H, Pickersgill H, Brummelkamp T, Marais R. Oncogenic Braf regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor Mitf. *PLoS One*. 2008;3(7):e2734.
126. Busca R, Berra E, Gaggioli C, Khaled M, Bille K, Marchetti B, Thyss R, Fitsialos G, Larribere L, Bertolotto C, Virolle T, Barbry P, Pouyssegur J, Ponzio G, Ballotti R. Hypoxia-inducible factor 1{alpha} is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) in melanoma cells. *J Cell Biol*. 2005 Jul 4;170(1):49–59.
127. Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, Merino M, Trepel J, Zbar B, Toro J, Ratcliffe PJ, Linehan WM, Neckers L. Hif overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of Hif stability. *Cancer Cell*. 2005 Aug;8(2):143–53.
128. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links Tca cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting Hif-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005 Jan;7(1):77–85.
129. Hay N. The Akt-Mtor tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*. 2005 Sep;8(3):179–83.
130. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of Pten facilitates Hif-1-mediated gene expression. *Genes Dev*. 2000 Feb 15;14(4):391–6.
131. Li YM, Zhou BP, Deng J, Pan Y, Hay N, Hung MC. A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt in Her2 overexpressing cells. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3257–63.

132. Lee HY, Lee T, Lee N, Yang EG, Lee C, Lee J, Moon EY, Ha J, Park H. Src activates Hif-1alpha not through direct phosphorylation of Hif-1alpha specific prolyl-4 hydroxylase 2 but through activation of the NADPH oxidase/Rac pathway. *Carcinogenesis*. 2011 May;32(5):703–12.
133. Chouaib S, El Hage F, Benlalam H, Mami-Chouaib F. [immunotherapy of cancer: promise and reality]. *Med Sci (Paris)*. 2006 Aug-Sep;22(8-9):755–9.
134. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329–60.

Author Proof

Annexe II

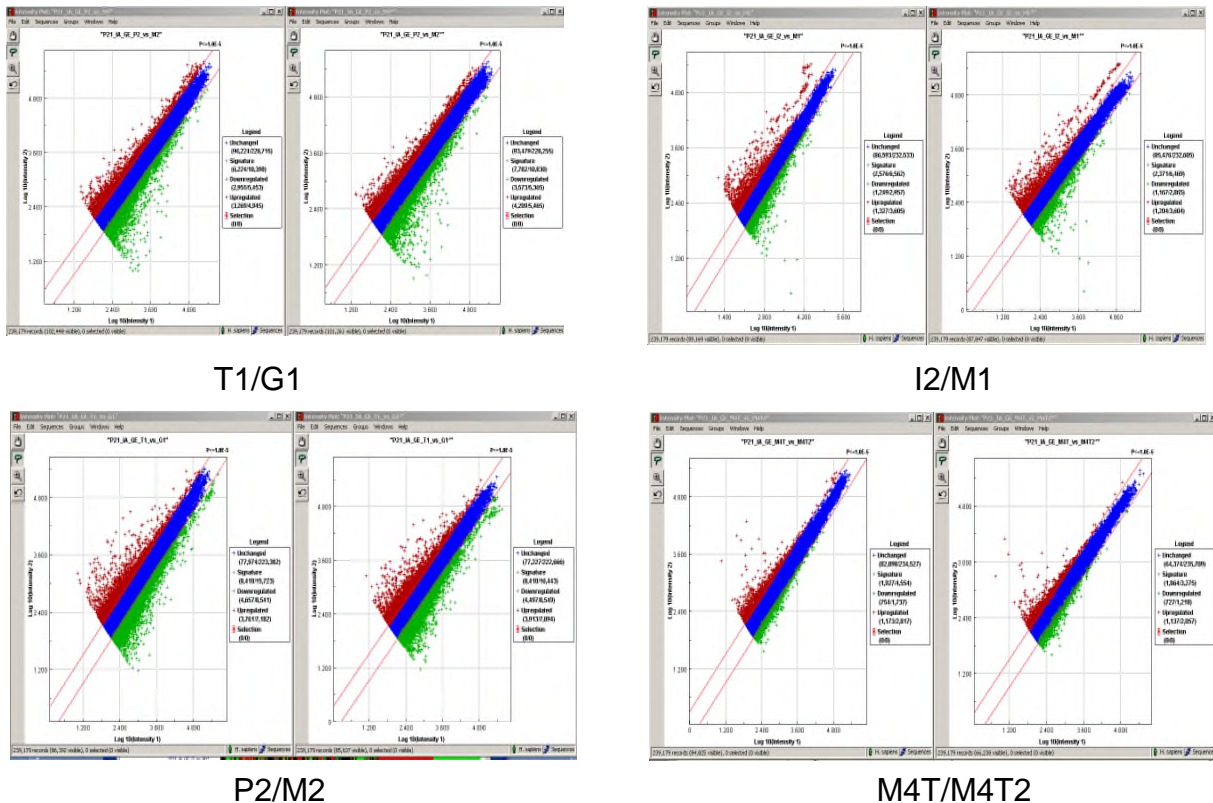


1- Contexte :

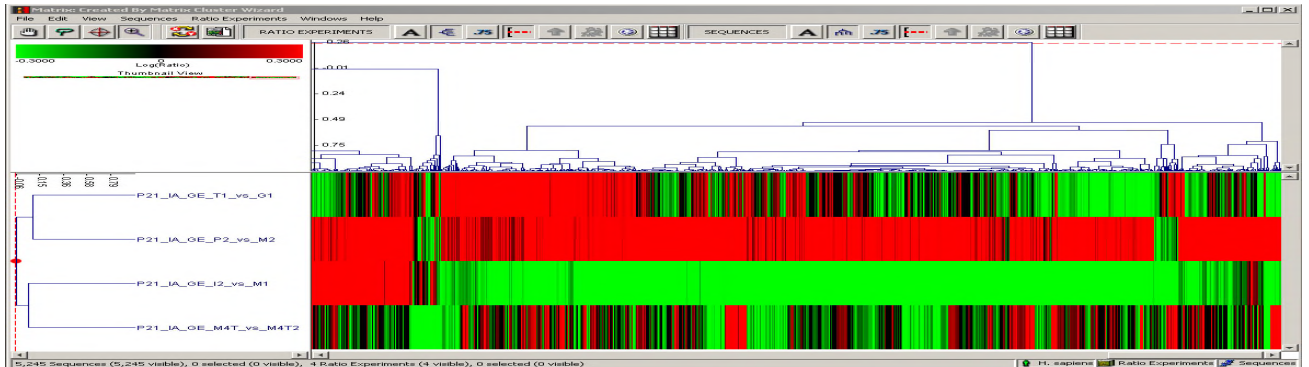
Pendant ma thèse, j’ai été financée par l’organisation Oséo dans le cadre d’un projet CAP (Cancer Anti-invasive Program) impliquant plusieurs équipes et plateformes. Le but de ce projet est l’identification d’un ou plusieurs marqueurs prédictifs/pronostiques de l’invasion, plus particulièrement, du mélanome. A cet effet, j’ai mené une étude comparative des profils génomiques entre des lignées primitives *versus* métastatiques autologues sur quatre couples de patients atteints de mélanome. J’ai pu ainsi identifier l’IL24 comme marqueur prédictif de l’invasion du mélanome. Les résultats que j’ai obtenus dans le cadre de ce projet sont résumés ci-dessous. J’ai été amenée également à établir quelques lignées cellulaires de mélanome primitif ou métastatique dont la méthode est décrite ci-dessous (partie matériel et méthodes).

Pour répondre à la question quant à l’existence d’un ou des marqueurs de l’invasion du mélanome, une étude comparative sur 4 couples de lignées de mélanome primitifs et métastatiques a été réalisée en utilisant des puces Agilent de 244 K.

Dans un premier temps, la comparaison des intensités du marquage entre les 4 couples montre que l’intensité du marquage sur le couple M4T, M4T2 est plus faible que celle sur les 3 autres couples (figure 1). Ceci pourrait être expliqué par le fait que M4T2 est une métastase cutanée alors que les métastases des trois autres couples sont ganglionnaires.

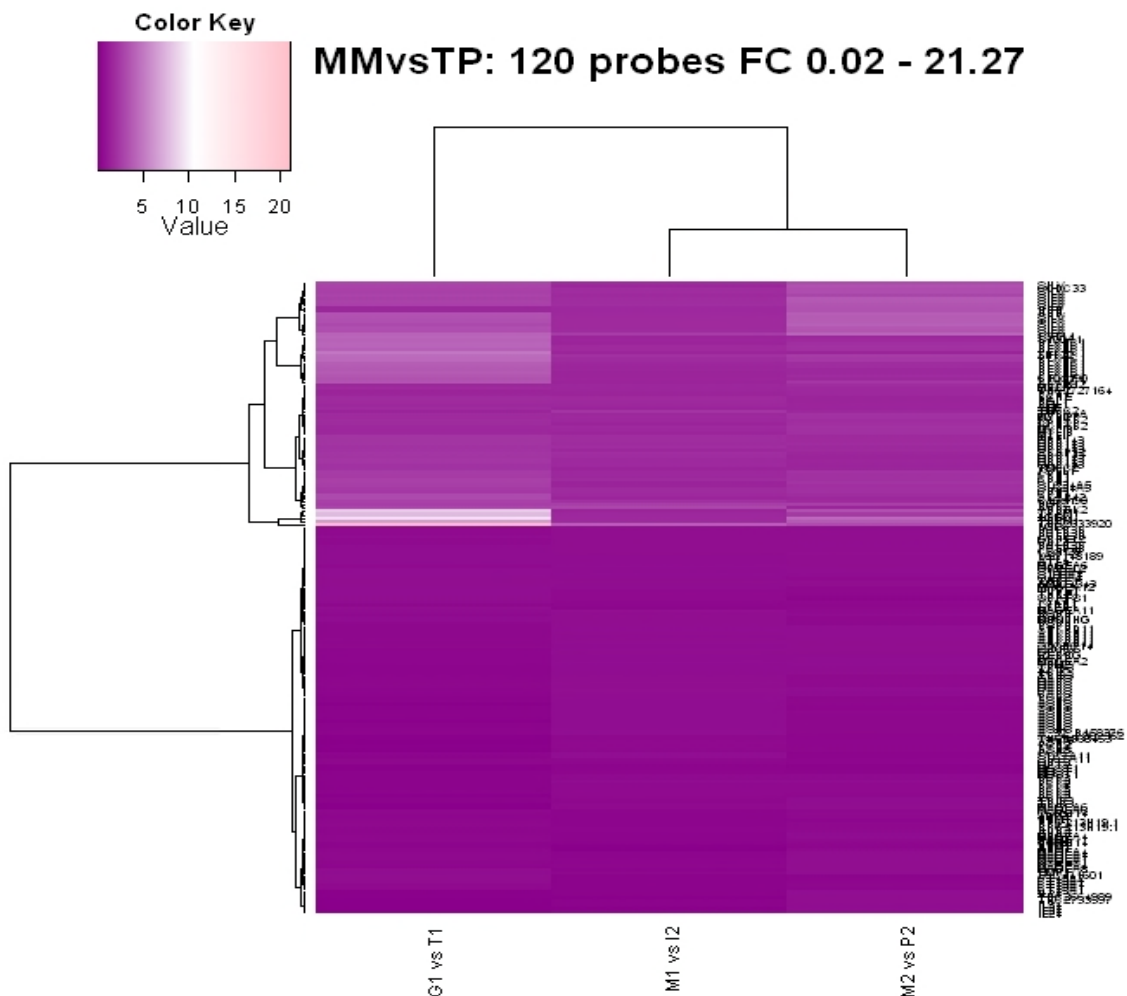


Outre la faible intensité du marquage sur le couple M4T, M4T2, la clustérisation des gènes de ce couple est nettement plus hétérogène que celle des trois autres couples (figure 2).



Par conséquent, la suite des analyses génomiques a été faite sur les 3 couples les plus homogènes parmi les quatre à savoir : T1, G1 ; I2, M1 et P2, M2.

Les résultats génomiques préliminaires sur ces 3 couples mettent en évidence 120 probes surexprimées dans le mélanome métastatique par rapport au mélanome primitif (figure 3) et 76 probes sous exprimées.



Ces analyses préliminaires ont nécessité d'être approfondies afin de pouvoir déterminer d'éventuel(s) marqueur(s) potentiel(s) de l'invasion du mélanome au cours de l'EC3.

2- L'étape clé 3 du projet

Au cours de cette étape, j'ai continué l'analyse des profils transcriptomiques sur les trois couples de lignées primitives/métastatiques. Cette analyse m'a permis ainsi l'identification d'un candidat potentiel de l'invasion du mélanome à savoir l'IL24. Ainsi, des analyses fonctionnelles notamment western blot, qRT-PCR et ELISA ont été faites pour valider ce marqueur (partie résultat).

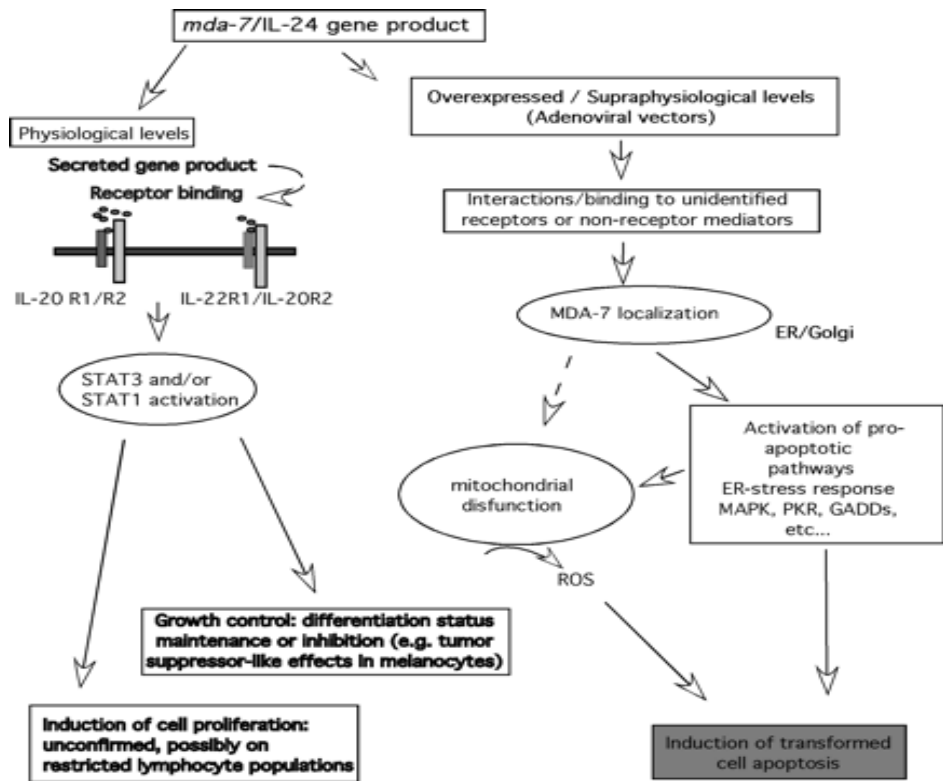
2-1- Matériels et méthodes

La biopsie reçue est découpée très finement à l'aide d'une pince et d'un scalpel en petits morceaux et dans un milieu stérile. Les fragments peuvent être conservés à 4°C au maximum 24h après le prélèvement dans un milieu de culture contenant du sérum humain.

Les cultures sont réalisées dans des plaques de cultures 24 puits en déposant un morceau par puit. Pour établir la lignée tumorale, les morceaux de biopsie découpés sont mis en culture dans un volume de 1.5 ml de milieu RPMI-1640 par puit contenant du sérum de veau fœtal (10%), des antibiotiques (1% de pénicilline/streptomycine) et L-glutamine (1%). Les premières cellules tumorales émergent du fragment tumoral, en moyenne, 3 à 4 mois après le début de la culture. Une période d'adaptation aux conditions de culture in vitro est nécessaire dont la durée est variable selon les cellules. Une fois établies, les cellules sont alors amplifiées et congelées. Les cellules tumorales sont caractérisées pour l'expression des molécules HLA classe I et HLA-B et -C, mais également pour l'expression de la protéine antigénique Melan-A/MART-1.

2-2- Résultats :

2-2-1- L'IL24 :



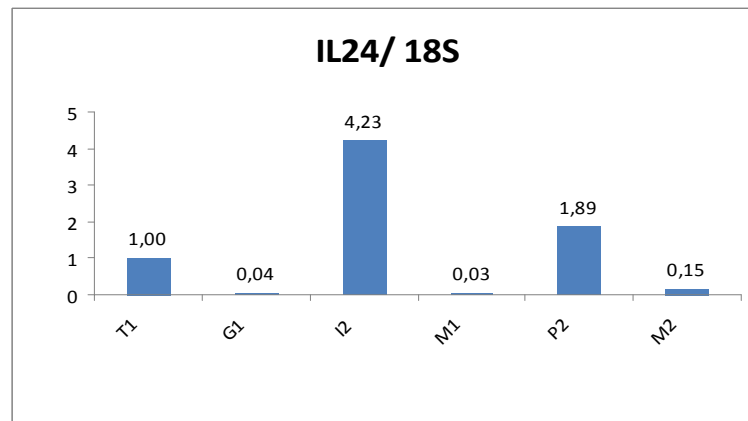
Suite aux analyses des résultats de génomique (EC2), un gène codant pour une protéine suppresseur de tumeur a été caractérisé (Figure 4). L'IL24 est parmi les gènes les plus fortement exprimé dans les 3 lignées de mélanome primitif par rapport à leurs correspondantes métastatiques. Ce gène semble être capable de contrôler la survie et la prolifération cellulaire via l'activation de certains facteurs de transcription (Stat-1 et Stat-3). La surexpression de ce gène dans les lignées primitives permet de le présenter comme un marqueur candidat de l'invasion du mélanome (Tableau 1).

1	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Accession #	-	Symbol	Description	signe	<FC(ME/TU)>	<Ratio ME/TU>	<LogRatio>	<Int1>	<Int2>	
307	CUST_189486_P1112	IGR3_189486	LOC440905	hypothetical LOC440905	----	-5.913233	0.17	0.77	25	324
308	A26C1A	A_24_P357950	POTEF	POTE ankyrin domain family, member F	----	-5.948398	0.17	0.77	83	220
309	CUST_84111_P1112	IGR3_084111	POTEF	POTE ankyrin domain family, member F	----	-5.989975	0.17	0.78	52	225
310	CUST_165587_P1112	IGR3_165587	POTEB	POTE ankyrin domain family, member B	----	-6.061778	0.16	0.78	71	243
311	CUST_185980_P1112	IGR3_185980	POTEE	POTE ankyrin domain family, member E	----	-6.06457	0.16	0.78	56	278
312	CUST_84109_P1112	IGR3_084109	POTEF	POTE ankyrin domain family, member F	----	-6.279138	0.16	0.80	87	157
313	CUST_48755_P1112	IGR3_048755	POTEG	POTE ankyrin domain family, member G	----	-7.103134	0.14	0.85	26	62
314	LOC284120	A_23_P250516	LOC284120	Unknown	----	-7.103952	0.14	0.85	5	210
315	CUST_189489_P1112	IGR3_189489	LOC440905	hypothetical LOC440905	----	-7.208585	0.14	0.86	53	251
316	CUST_84106_P1112	IGR3_084106	POTEF	POTE ankyrin domain family, member F	----	-7.297095	0.14	0.86	77	213
317	CUST_84104_P1112	IGR3_084104	POTEB	POTE ankyrin domain familv, member B	----	-8.558054	0.12	0.93	69	808
318	CUST_114775_P1112	IGR3_114775	IL24	interleukin 24	----	-8.645199	0.12	0.94	49	

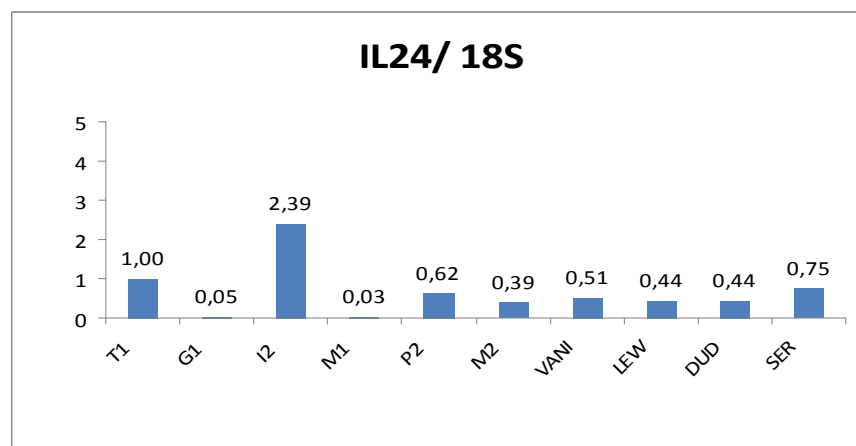
Comme le montre la figure 6, l'IL24 est le gène le plus fortement exprimé dans l'ensemble des lignées primitives étudiées en comparaison avec leurs correspondantes métastatiques, avec un Fold change de -8,6451 (rapport métastase *versus* primitive).

2-2-2- Validation du gène candidat avec la technique Taqman:

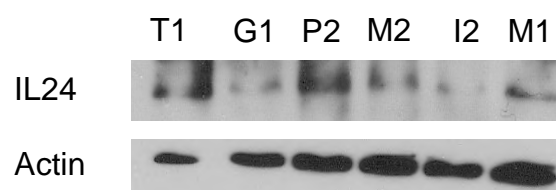
La confirmation des résultats obtenus sur les puces Agilent a été également réalisée par qRT-PCR (Figure 5).



L'étude de l'expression de l'IL24 a été également faite sur un panel de lignées métastatiques de mélanome (VANI, LEW, DUD et SER) montrant que ces dernières expriment très faiblement l'IL24 en comparaison avec les lignées primitives constituant le modèle d'étude (Figure 6).

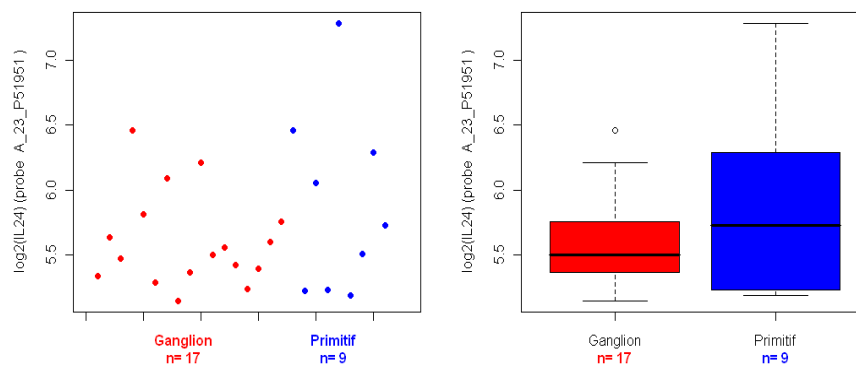


2-2-3- Validation au niveau protéique par western blot:



Des analyses fonctionnelles ont été effectuées. Le résultat de l'analyse génomique a été confirmé, premièrement, en étudiant l'expression de la protéine par Western Blot sur les 3 couples de lignées métastase/primitive de mélanome (Figure 7). Contrairement aux couples T1/G1 et P2/M2, le résultat n'est pas confirmé sur le couple I2/M1.

2-2-4- Comparaison de nos résultats obtenus sur les lignées tumorales avec les patients du département de Dermatologie:



La comparaison de nos résultats avec ceux de l'équipe de Caroline Robert va dans le même sens, chose qui nous réconforte dans choix de ce gène IL24 comme marqueur candidat potentiel de l'invasion du mélanome (Figure 8).

3- Conclusions et perspectives:

La fréquence des tumeurs primitives est faible, et l'établissement de couples primitives/métastatiques doit être confirmé dans le cadre d'une étude prospective pour accroître le panel.

On souhaiterait continuer l'étude sur l'IL24 sur un panel d'échantillons plus élargi et également étudier l'expression de ce marqueur dans des plasmas de patients atteint de mélanome, étude que j'ai déjà commencé à effectuer à l'ENS Cachan. Ainsi on pourrait rechercher une éventuelle corrélation entre l'expression de l'IL24 et les marqueurs identifiés par les autres équipes du consortium.

Références bibliographiques

Abeliovich, H., Dunn, W.A., Jr., Kim, J., and Klionsky, D.J. (2000). Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *The Journal of cell biology* 151, 1025-1034.

Abeliovich, H., Zhang, C., Dunn, W.A., Jr., Shokat, K.M., and Klionsky, D.J. (2003). Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a non-kinase role in the induction of autophagy. *Molecular biology of the cell* 14, 477-490.

Abida, W.M., and Gu, W. (2008). p53-Dependent and p53-independent activation of autophagy by ARF. *Cancer research* 68, 352-357.

Abraham, B.K., Fritz, P., McClellan, M., Hauptvogel, P., Athellogou, M., and Brauch, H. (2005). Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 1154-1159.

Adrain, C., Duriez, P.J., Brumatti, G., Delivani, P., and Martin, S.J. (2006). The cytotoxic lymphocyte protease, granzyme B, targets the cytoskeleton and perturbs microtubule polymerization dynamics. *The Journal of biological chemistry* 281, 8118-8125.

Agace, W.W. (2006). Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nature reviews Immunology* 6, 682-692.

Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54-60.

Akalay, I., Janji, B., Hasmim, M., Noman, M.Z., Andre, F., De Cremoux, P., Bertheau, P., Badoual, C., Vielh, P., Larsen, A.K., *et al.* (2013a). Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer research* 73, 2418-2427.

Akalay, I., Janji, B., Hasmim, M., Noman, M.Z., Thiery, J.P., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2013b). EMT impairs breast carcinoma cell susceptibility to CTL-mediated lysis through autophagy induction. *Autophagy* 9.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3983-3988.

Al Saleh, S., Al Mulla, F., and Luqmani, Y.A. (2011). Estrogen receptor silencing induces epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer cells. *PloS one* 6, e20610.

Alison, M.R., Lim, S.M., and Nicholson, L.J. (2011). Cancer stem cells: problems for therapy? *The Journal of pathology* 223, 147-161.

Allenspach, E.J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A.G., Cannon, J.L., Takahashi, S.M., Morgan, R., Burkhardt, J.K., and Sperling, A.I. (2001). ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 15, 739-750.

Amaravadi, R.K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X.M., Weiss, W.A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R.S., Lotze, M.T., and White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 654-666.

Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., *et al.* (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *The Journal of experimental medicine* 195, 1303-1316.

Andzelm, M.M., Chen, X., Krzewski, K., Orange, J.S., and Strominger, J.L. (2007). Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *The Journal of experimental medicine* 204, 2285-2291.

Anido, J., Saez-Borderias, A., Gonzalez-Junca, A., Rodon, L., Folch, G., Carmona, M.A., Prieto-Sanchez, R.M., Barba, I., Martinez-Saez, E., Prudkin, L., *et al.* (2010). TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer cell* 18, 655-668.

Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T.N., Thomas, V.K., Dustin, M.L., and Sykulev, Y. (2005). Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6437-6442.

Ano, Y., Hattori, T., Oku, M., Mukaiyama, H., Baba, M., Ohsumi, Y., Kato, N., and Sakai, Y. (2005). A sorting nexin PpAtg24 regulates vacuolar membrane dynamics during pexophagy via binding to phosphatidylinositol-3-phosphate. *Molecular biology of the cell* 16, 446-457.

Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., *et al.* (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer cell* 14, 79-89.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., Mariette, C., Chaput, N., Mira, J.P., Delaloge, S., *et al.* (2007). The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunological reviews* 220, 47-59.

Asiedu, M.K., Ingle, J.N., Behrens, M.D., Radisky, D.C., and Knutson, K.L. (2011). TGFbeta/TNF(alpha)-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer research* 71, 4707-4719.

Azad, M.B., Chen, Y., Henson, E.S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S.J., and Gibson, S.B. (2008). Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* 4, 195-204.

Baetz, K., Isaaz, S., and Griffiths, G.M. (1995). Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. *J Immunol* 154, 6122-6131.

Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., and Henkart, P.A. (2002). Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *The Journal of experimental medicine* 196, 493-503.

Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-3161.

Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology* 2, 84-89.

Baud, V., and Karin, M. (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature reviews Drug discovery* 8, 33-40.

Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and cellular biology* 29, 2570-2581.

Benitez, R., Godelaine, D., Lopez-Nevot, M.A., Brasseur, F., Jimenez, P., Marchand, M., Oliva, M.R., van Baren, N., Cabrera, T., Andry, G., *et al.* (1998). Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue antigens* 52, 520-529.

Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a003129.

Bhat-Nakshatri, P., Appaiah, H., Ballas, C., Pick-Franke, P., Goulet, R., Jr., Badve, S., Srour, E.F., and Nakshatri, H. (2010). SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC cancer* 10, 411.

Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology* 196, 254-265.

Biswas, S., Guix, M., Rinehart, C., Dugger, T.C., Chytil, A., Moses, H.L., Freeman, M.L., and Arteaga, C.L. (2007). Inhibition of TGF-beta with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *The Journal of clinical investigation* 117, 1305-1313.

Bladergroen, B.A., Meijer, C.J., ten Berge, R.L., Hack, C.E., Muris, J.J., Dukers, D.F., Chott, A., Kazama, Y., Oudejans, J.J., van Berkum, O., *et al.* (2002). Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* 99, 232-237.

Blommaart, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelarova, H., and Meijer, A.J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* 243, 240-246.

Blott, E.J., and Griffiths, G.M. (2002). Secretory lysosomes. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 122-131.

Boissonnas, A., Fetler, L., Zeelenberg, I.S., Hugues, S., and Amigorena, S. (2007). In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *The Journal of experimental medicine* 204, 345-356.

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Bolitho, P., Voskoboinik, I., Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2007). Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Current opinion in immunology* 19, 339-347.

Bonde, A.K., Tischler, V., Kumar, S., Soltermann, A., and Schwendener, R.A. (2012). Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC cancer* 12, 35.

Boon, T., Cerottini, J.C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annual review of immunology* 12, 337-365.

Borrello, M.G., Alberti, L., Fischer, A., Degl'innocenti, D., Ferrario, C., Gariboldi, M., Marchesi, F., Allavena, P., Greco, A., Collini, P., *et al.* (2005). Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14825-14830.

Bossi, G., and Griffiths, G.M. (1999). Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nature medicine* 5, 90-96.

Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G.M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunological reviews* 189, 152-160.

Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., and Kirchner, T. (2005). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells, tissues, organs* 179, 56-65.

Breart, B., Lemaitre, F., Celli, S., and Bousso, P. (2008). Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice. *The Journal of clinical investigation* 118, 1390-1397.

Broderick, L., Brooks, S.P., Takita, H., Baer, A.N., Bernstein, J.M., and Bankert, R.B. (2006). IL-12 reverses anergy to T cell receptor triggering in human lung tumor-associated memory T cells. *Clin Immunol* 118, 159-169.

Brown, C.E., Vishwanath, R.P., Aguilar, B., Starr, R., Najbauer, J., Aboody, K.S., and Jensen, M.C. (2007). Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. *J Immunol* 179, 3332-3341.

Bryant, D.M., and Mostov, K.E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 887-901.

Bryceson, Y.T., Rudd, E., Zheng, C., Edner, J., Ma, D., Wood, S.M., Bechensteen, A.G., Boelens, J.J., Celkan, T., Farah, R.A., *et al.* (2007). Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients. *Blood* 110, 1906-1915.

Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., and Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports* 9, 582-589.

Caja, L., Bertran, E., Campbell, J., Fausto, N., and Fabregat, I. (2011). The transforming growth factor-beta (TGF-beta) mediates acquisition of a mesenchymal stem cell-like phenotype in human liver cells. *Journal of cellular physiology* 226, 1214-1223.

Calone, I., and Souchelnytskyi, S. (2012). Inhibition of TGFbeta signaling and its implications in anticancer treatments. *Experimental oncology* 34, 9-16.

Calzascia, T., Masson, F., Di Bernardino-Besson, W., Contassot, E., Wilmotte, R., Aurrand-Lions, M., Ruegg, C., Dietrich, P.Y., and Walker, P.R. (2005). Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity* 22, 175-184.

Campbell, L.L., and Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 6, 2332-2338.

Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology* 2, 76-83.

Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635-646.

Carey, L.A., Dees, E.C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D.T., Collichio, F., Ollila, D.W., Sartor, C.I., Graham, M.L., and Perou, C.M. (2007). The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of

breast cancer subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 2329-2334.

Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1014, 58-66.

Cemerski, S., Das, J., Giurisato, E., Markiewicz, M.A., Allen, P.M., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S. (2008). The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality. *Immunity* 29, 414-422.

Chaffer, C.L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A.J., Wiggins, P.A., Rodrigues, L.O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., *et al.* (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 7950-7955.

Champagne, P., Ogg, G.S., King, A.S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G.P., Fleury, S., Lipp, M., *et al.* (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410, 106-111.

Chang, C.J., Chao, C.H., Xia, W., Yang, J.Y., Xiong, Y., Li, C.W., Yu, W.H., Rehman, S.K., Hsu, J.L., Lee, H.H., *et al.* (2011). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nature cell biology* 13, 317-323.

Chang, Y., Yan, W., He, X., Zhang, L., Li, C., Huang, H., Nace, G., Geller, D.A., Lin, J., and Tsung, A. (2012). miR-375 inhibits autophagy and reduces viability of hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions. *Gastroenterology* 143, 177-187 e178.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.

Christoffersen, N.R., Silahatoglu, A., Orom, U.A., Kauppinen, S., and Lund, A.H. (2007). miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFHXB. *RNA* 13, 1172-1178.

Chua, K.N., Sim, W.J., Racine, V., Lee, S.Y., Goh, B.C., and Thiery, J.P. (2012). A cell-based small molecule screening method for identifying inhibitors of epithelial-mesenchymal transition in carcinoma. *PloS one* 7, e33183.

Claerhout, S., Verschooten, L., Van Kelst, S., De Vos, R., Proby, C., Agostinis, P., and Garmyn, M. (2010). Concomitant inhibition of AKT and autophagy is required for efficient cisplatin-induced apoptosis of metastatic skin carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 127, 2790-2803.

Clark, R., and Griffiths, G.M. (2003). Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Current opinion in immunology* 15, 516-521.

Cochrane, D.R., Spoelstra, N.S., Howe, E.N., Nordeen, S.K., and Richer, J.K. (2009). MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Molecular cancer therapeutics* 8, 1055-1066.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569.

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huybreck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular cell* 7, 1267-1278.

Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-266.

Copetti, T., Bertoli, C., Dalla, E., Demarchi, F., and Schneider, C. (2009). p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Molecular and cellular biology* 29, 2594-2608.

Corcelle, E., Djerbi, N., Mari, M., Nebout, M., Fiorini, C., Fenichel, P., Hofman, P., Poujeol, P., and Mograbi, B. (2007). Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy* 3, 57-59.

Creighton, C.J., Li, X., Landis, M., Dixon, J.M., Neumeister, V.M., Sjolund, A., Rimm, D.L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J.I., *et al.* (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13820-13825.

Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, 121-134.

Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H., Maiuri, M.C., Morselli, E., Vitale, I., Kepp, O., Tasdemir, E., Galluzzi, L., Shen, S., *et al.* (2010). IKK connects autophagy to major stress pathways. *Autophagy* 6, 189-191.

Cufi, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Martin-Castillo, B., Vellon, L., and Menendez, J.A. (2011). Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle* 10, 3871-3885.

Dan, H.C., and Baldwin, A.S. (2008). Differential involvement of IkappaB kinases alpha and beta in cytokine- and insulin-induced mammalian target of rapamycin activation determined by Akt. *J Immunol* 180, 7582-7589.

Darsow, T., Rieder, S.E., and Emr, S.D. (1997). A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *The Journal of cell biology* 138, 517-529.

Das, V., Nal, B., Roumier, A., Meas-Yedid, V., Zimmer, C., Olivo-Marin, J.C., Roux, P., Ferrier, P., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2002). Membrane-cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation. *Immunological reviews* 189, 123-135.

Dassie, J.P., Liu, X.Y., Thomas, G.S., Whitaker, R.M., Thiel, K.W., Stockdale, K.R., Meyerholz, D.K., McCaffrey, A.P., McNamara, J.O., 2nd, and Giangrande, P.H. (2009). Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nature biotechnology* 27, 839-849.

De Craene, B., van Roy, F., and Berx, G. (2005). Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cellular signalling* 17, 535-547.

de Visser, K.E., Korets, L.V., and Coussens, L.M. (2005). De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer cell* 7, 411-423.

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gelinas, C., Fan, Y., *et al.* (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell* 10, 51-64.

Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R.N. (2001). Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 15, 691-701.

Deng, A., Chen, S., Li, Q., Lyu, S.C., Clayberger, C., and Krensky, A.M. (2005). Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 174, 5243-5248.

Disis, M.L., Schiffman, K., Salazar, L.G., Almand, B., and Knutson, K.L. (2003). HER-2/neu vaccines. *Cancer chemotherapy and biological response modifiers* 21, 275-285.

Djavaheri-Mergny, M., Amelotti, M., Mathieu, J., Besancon, F., Bauvy, C., Souquere, S., Pierron, G., and Codogno, P. (2006). NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *The Journal of biological chemistry* 281, 30373-30382.

Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W.M., Clarke, M.F., and Wicha, M.S. (2003). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell proliferation* 36 Suppl 1, 59-72.

Dumont, N., Wilson, M.B., Crawford, Y.G., Reynolds, P.A., Sigaroudinia, M., and Tlsty, T.D. (2008). Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14867-14872.

Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K., Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2008). The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer cell* 13, 343-354.

Dustin, M.L. (2002). Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready. *The Journal of clinical investigation* 109, 155-160.

Egen, J.G., Kuhns, M.S., and Allison, J.P. (2002). CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nature immunology* 3, 611-618.

Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., Berx, G., Cano, A., Beug, H., and Foisner, R. (2005). DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 24, 2375-2385.

Elgert, K.D., Alleva, D.G., and Mullins, D.W. (1998). Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *Journal of leukocyte biology* 64, 275-290.

Erlich, S., Mizrachy, L., Segev, O., Lindenboim, L., Zmira, O., Adi-Harel, S., Hirsch, J.A., Stein, R., and Pinkas-Kramarski, R. (2007). Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy* 3, 561-568.

Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., Sorokin, A., Ovchinnikov, L.P., Davicioni, E., Triche, T.J., *et al.* (2009). Translational activation of snail and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer cell* 15, 402-415.

Ewald, J.A., Desotelle, J.A., Wilding, G., and Jarrard, D.F. (2010). Therapy-induced senescence in cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 102, 1536-1546.

Exley, M.A., Tahir, S.M., Cheng, O., Shaulov, A., Joyce, R., Avigan, D., Sackstein, R., and Balk, S.P. (2001). A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol* 167, 5531-5534.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 1206-1212.

Fang, X., Cai, Y., Liu, J., Wang, Z., Wu, Q., Zhang, Z., Yang, C.J., Yuan, L., and Ouyang, G. (2011). Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal. *Oncogene* 30, 4707-4720.

Farabaugh, S.M., Micalizzi, D.S., Jedlicka, P., Zhao, R., and Ford, H.L. (2012). Eya2 is required to mediate the pro-metastatic functions of Six1 via the induction of TGF-beta signaling, epithelial-mesenchymal transition, and cancer stem cell properties. *Oncogene* 31, 552-562.

Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., *et al.* (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 24, 4660-4671.

Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Charadin, M., Chedeville, G., Tamary, H., *et al.* (2003). Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115, 461-473.

Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8204-8209.

Ferlay, J., Parkin, D.M., and Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46, 765-781.

Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., *et al.* (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7464-7469.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews Cancer* 3, 453-458.

Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., *et al.* (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121-1125.

Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T., and Ioannides, C.G. (1995). Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *The Journal of experimental medicine* 181, 2109-2117.

Fowler, K.T., Andrews, N.W., and Huleatt, J.W. (2007). Expression and function of synaptotagmin VII in CTLs. *J Immunol* 178, 1498-1504.

Fraga, M.F., Herranz, M., Espada, J., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Erkek, E., Bozdogan, O., Peinado, H., Niveleau, A., *et al.* (2004). A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer research* 64, 5527-5534.

Frankel, L.B., Wen, J., Lees, M., Hoyer-Hansen, M., Farkas, T., Krogh, A., Jaattela, M., and Lund, A.H. (2011). microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *The EMBO journal* 30, 4628-4641.

Fraser, S.A., Karimi, R., Michalak, M., and Hudig, D. (2000). Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. *J Immunol* 164, 4150-4155.

Freiberg, B.A., Kupfer, H., Maslanik, W., Delli, J., Kappler, J., Zaller, D.M., and Kupfer, A. (2002). Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nature immunology* 3, 911-917.

Friedl, P., den Boer, A.T., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature reviews Immunology* 5, 532-545.

Fritah, A., Saucier, C., De Wever, O., Bracke, M., Bieche, I., Lidereau, R., Gespach, C., Drouot, S., Redeuilh, G., and Sabbah, M. (2008). Role of WISP-2/CCN5 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in human breast cancer cells. *Molecular and cellular biology* 28, 1114-1123.

Gabrilovich, D.I., Ciernik, I.F., and Carbone, D.P. (1996). Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cellular immunology* 170, 101-110.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology* 9, 162-174.

Gal, A., Sjoblom, T., Fedorova, L., Imreh, S., Beug, H., and Moustakas, A. (2008). Sustained TGF beta exposure suppresses Smad and non-Smad signalling in mammary epithelial cells, leading to EMT and inhibition of growth arrest and apoptosis. *Oncogene* 27, 1218-1230.

Galavotti, S., Bartesaghi, S., Faccenda, D., Shaked-Rabi, M., Sanzone, S., McEvoy, A., Dinsdale, D., Condorelli, F., Brandner, S., Campanella, M., *et al.* (2013). The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32, 699-712.

Ganapathy, V., Ge, R., Grazioli, A., Xie, W., Banach-Petrosky, W., Kang, Y., Lonning, S., McPherson, J., Yingling, J.M., Biswas, S., *et al.* (2010). Targeting the Transforming Growth Factor-beta pathway inhibits human basal-like breast cancer metastasis. *Molecular cancer* 9, 122.

Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., and Durandy, A. (1999). TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 162, 4567-4575.

Gewirtz, D.A. (2009). Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy* 5, 1232-1234.

Geyer, C.E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C.G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., *et al.* (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine* 355, 2733-2743.

Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C.S., and Sahai, E. (2009). Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nature cell biology* 11, 1287-1296.

Giannoni, E., Parri, M., and Chiarugi, P. (2012). EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy. *Antioxidants & redox signaling* 16, 1248-1263.

Gibbons, D.L., Lin, W., Creighton, C.J., Rizvi, Z.H., Gregory, P.A., Goodall, G.J., Thilaganathan, N., Du, L., Zhang, Y., Pertsemliadis, A., *et al.* (2009). Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. *Genes & development* 23, 2140-2151.

Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174, 1783-1786.

Gong, C., Bauvy, C., Tonelli, G., Yue, W., Delomenie, C., Nicolas, V., Zhu, Y., Domergue, V., Marin-Esteban, V., Tharinger, H., *et al.* (2013). Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene* 32, 2261-2272, 2272e 2261-2211.

Goping, I.S., Sawchuk, T., Underhill, D.A., and Bleackley, R.C. (2006). Identification of {alpha}-tubulin as a granzyme B substrate during CTL-mediated apoptosis. *Journal of cell science* 119, 858-865.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.

Graubert, T.A., Russell, J.H., and Ley, T.J. (1996). The role of granzyme B in murine models of acute graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood* 87, 1232-1237.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, 1127-1130.

Greenburg, G., and Hay, E.D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *The Journal of cell biology* 95, 333-339.

Gregory, P.A., Bracken, C.P., Bert, A.G., and Goodall, G.J. (2008). MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7, 3112-3118.

Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734-738.

Grujic, M., Braga, T., Lukinius, A., Eloranta, M.L., Knight, S.D., Pejler, G., and Abrink, M. (2005). Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *The Journal of biological chemistry* 280, 33411-33418.

Guerra, N., Michel, F., Gati, A., Gaudin, C., Mishal, Z., Escudier, B., Acuto, O., Chouaib, S., and Caignard, A. (2002). Engagement of the inhibitory receptor CD158a interrupts TCR signaling, preventing dynamic membrane reorganization in CTL/tumor cell interaction. *Blood* 100, 2874-2881.

Guo, J.Y., Chen, H.Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M., Karantza, V., *et al.* (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & development* 25, 460-470.

Gupta, P.B., Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2009). Cancer stem cells: mirage or reality? *Nature medicine* 15, 1010-1012.

Hajra, K.M., Chen, D.Y., and Fearon, E.R. (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer research* 62, 1613-1618.

Hamai, A., Meslin, F., Benlalam, H., Jalil, A., Mehrpour, M., Faure, F., Lecluse, Y., Vielh, P., Avril, M.F., Robert, C., *et al.* (2008). ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer research* 68, 9854-9864.

Hartwell, K.A., Muir, B., Reinhardt, F., Carpenter, A.E., Sgroi, D.C., and Weinberg, R.A. (2006). The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18969-18974.

Hasmim, M., Noman, M.Z., Lauriol, J., Benlalam, H., Mallavialle, A., Rosselli, F., Mami-Chouaib, F., Alcaide-Loridan, C., and Chouaib, S. (2011). Hypoxia-dependent inhibition of tumor cell susceptibility to CTL-mediated lysis involves NANOG induction in target cells. *J Immunol* 187, 4031-4039.

Hemavathy, K., Ashraf, S.I., and Ip, Y.T. (2000). Snail/slugg family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257, 1-12.

Herranz, N., Pasini, D., Diaz, V.M., Franci, C., Gutierrez, A., Dave, N., Escriva, M., Hernandez-Munoz, I., Di Croce, L., Helin, K., *et al.* (2008). Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail transcription factor. *Molecular and cellular biology* 28, 4772-4781.

Herschkowitz, J.I., Zhao, W., Zhang, M., Usary, J., Murrow, G., Edwards, D., Knezevic, J., Greene, S.B., Darr, D., Troester, M.A., *et al.* (2012). Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2778-2783.

Hollenbeck, P. (2001). Cytoskeleton: Microtubules get the signal. *Current biology : CB* 11, R820-823.

Holt, O., Kanno, E., Bossi, G., Booth, S., Daniele, T., Santoro, A., Arico, M., Saegusa, C., Fukuda, M., and Griffiths, G.M. (2008). Slp1 and Slp2-a localize to the plasma membrane of CTL and contribute to secretion from the immunological synapse. *Traffic* 9, 446-457.

Homey, B., Alenius, H., Muller, A., Soto, H., Bowman, E.P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A.I., Assmann, T., Bunemann, E., *et al.* (2002). CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nature medicine* 8, 157-165.

Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., *et al.* (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC genomics* 7, 96.

Huang, Y., Guerrero-Preston, R., and Ratovitski, E.A. (2012). Phospho-DeltaNp63alpha-dependent regulation of autophagic signaling through transcription and micro-RNA modulation. *Cell Cycle* 11, 1247-1259.

Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature reviews Immunology* 3, 973-983.

Hurteau, G.J., Carlson, J.A., Spivack, S.D., and Brock, G.J. (2007). Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer research* 67, 7972-7976.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., *et al.* (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2005). Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 54, 1127-1136.

Iizumi, M., Liu, W., Pai, S.K., Furuta, E., and Watabe, K. (2008). Drug development against metastasis-related genes and their pathways: a rationale for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta* 1786, 87-104.

Iliopoulos, D., Lindahl-Allen, M., Polytarchou, C., Hirsch, H.A., Tschlis, P.N., and Struhl, K. (2010). Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Molecular cell* 39, 761-772.

Illman, S.A., Lehti, K., Keski-Oja, J., and Lohi, J. (2006). Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *Journal of cell science* 119, 3856-3865.

Inoki, K., Corradetti, M.N., and Guan, K.L. (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nature genetics* 37, 19-24.

Inukai, T., Inoue, A., Kurosawa, H., Goi, K., Shinjyo, T., Ozawa, K., Mao, M., Inaba, T., and Look, A.T. (1999). SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Molecular cell* 4, 343-352.

Jaaskelainen, J., Maenpaa, A., Patarroyo, M., Gahmberg, C.G., Somersalo, K., Tarkkanen, J., Kallio, M., and Timonen, T. (1992). Migration of recombinant IL-2-activated T and natural killer cells in the intercellular space of human H-2 glioma spheroids in vitro. A study on adhesion molecules involved. *J Immunol* 149, 260-268.

Jegga, A.G., Schneider, L., Ouyang, X., and Zhang, J. (2011). Systems biology of the autophagy-lysosomal pathway. *Autophagy* 7, 477-489.

Jiang, J., Tang, Y.L., and Liang, X.H. (2011). EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer biology & therapy* 11, 714-723.

Jiang, M., and Dong, Z. (2008). Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 327, 300-307.

Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. (2002). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111, 837-851.

Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism* 1, 15-25.

Kajita, M., McClinic, K.N., and Wade, P.A. (2004). Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Molecular and cellular biology* 24, 7559-7566.

Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2007). Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *International journal of oncology* 31, 277-283.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 1420-1428.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of cell biology* 150, 1507-1513.

Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I.M., Kondo, Y., and Kondo, S. (2005). Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* 24, 980-991.

Kaspar, A.A., Okada, S., Kumar, J., Poulain, F.R., Drouvalakis, K.A., Kelekar, A., Hanson, D.A., Kluck, R.M., Hitoshi, Y., Johnson, D.E., *et al.* (2001). A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. *J Immunol* 167, 350-356.

Kawai, A., Uchiyama, H., Takano, S., Nakamura, N., and Ohkuma, S. (2007). Autophagosome-lysosome fusion depends on the pH in acidic compartments in CHO cells. *Autophagy* 3, 154-157.

Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K., and Yagita, H. (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *The Journal of experimental medicine* 182, 1777-1783.

Kiessling, R., Wasserman, K., Horiguchi, S., Kono, K., Sjoberg, J., Pisa, P., and Petersson, M. (1999). Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 48, 353-362.

Kim, J., Huang, W.P., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2002). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *The Journal of biological chemistry* 277, 763-773.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of cell biology* 147, 435-446.

Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science* 118, 7-18.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., *et al.* (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell* 5, 539-545.

Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-1721.

Klymkowsky, M.W., and Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American journal of pathology* 174, 1588-1593.

Knutson, K.L., Lu, H., Stone, B., Reiman, J.M., Behrens, M.D., Prosperi, C.M., Gad, E.A., Smorlesi, A., and Disis, M.L. (2006). Immunoediting of cancers may lead to epithelial to mesenchymal transition. *J Immunol* 177, 1526-1533.

Kochl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y., and Tooze, S.A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* 7, 129-145.

Koneru, M., Schaer, D., Monu, N., Ayala, A., and Frey, A.B. (2005). Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *J Immunol* 174, 1830-1840.

Kono, K., Rongcun, Y., Charo, J., Ichihara, F., Celis, E., Sette, A., Appella, E., Sekikawa, T., Matsumoto, Y., and Kiessling, R. (1998). Identification of HER2/neu-derived peptide epitopes recognized by gastric cancer-specific cytotoxic T lymphocytes. *International journal of cancer Journal international du cancer* 78, 202-208.

Korkmaz, G., le Sage, C., Tekirdag, K.A., Agami, R., and Gozuacik, D. (2012). miR-376b controls starvation and mTOR inhibition-related autophagy by targeting ATG4C and BECN1. *Autophagy* 8, 165-176.

Korpak, M., Lee, E.S., Hu, G., and Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The Journal of biological chemistry* 283, 14910-14914.

Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., *et al.* (2009). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137, 1005-1017.

Kovaleva, V., Mora, R., Park, Y.J., Plass, C., Chiramel, A.I., Bartenschlager, R., Dohner, H., Stilgenbauer, S., Pscherer, A., Lichter, P., *et al.* (2012). miRNA-130a targets ATG2B and DICER1 to inhibit autophagy and trigger killing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer research* 72, 1763-1772.

Kroemer, G., Marino, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* 40, 280-293.

Krzewski, K., Chen, X., and Strominger, J.L. (2008). WIP is essential for lytic granule polarization and NK cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2568-2573.

Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T., and Kawakami, Y. (2009). Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer cell* 15, 195-206.

Kuhn, J.R., and Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 16, 111-121.

Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2002). Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *The Journal of biological chemistry* 277, 18619-18625.

Kummer, J.A., Kamp, A.M., Citarella, F., Horrovoets, A.J., and Hack, C.E. (1996). Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. *The Journal of biological chemistry* 271, 9281-9286.

Kupfer, A., Dennert, G., and Singer, S.J. (1985). The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. *The Journal of molecular and cellular immunology : JMCI* 2, 37-49.

Kupfer, A., Swain, S.L., and Singer, S.J. (1987). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *The Journal of experimental medicine* 165, 1565-1580.

Kurrey, N.K., Jalgaonkar, S.P., Joglekar, A.V., Ghanate, A.D., Chaskar, P.D., Doiphode, R.Y., and Bapat, S.A. (2009). Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells* 27, 2059-2068.

Kuta, A.E., Bashford, C.L., Pasternak, C.A., Reynolds, C.W., and Henkart, P.A. (1991). Characterization of non-lytic cytolysin-membrane intermediates. *Molecular immunology* 28, 1263-1270.

Lacroix, M. (2006). Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-related cancer* 13, 1033-1067.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2005). Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Current opinion in immunology* 17, 326-332.

Lau, L.L., Jamieson, B.D., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1994). Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 369, 648-652.

Ledgerwood, L.G., Lal, G., Zhang, N., Garin, A., Esses, S.J., Ginhoux, F., Merad, M., Peche, H., Lira, S.A., Ding, Y., *et al.* (2008). The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics. *Nature immunology* 9, 42-53.

Lewandowski, S.A., Thiery, J., Jalil, A., Leclercq, G., Szczylik, C., and Chouaib, S. (2005). Opposite effects of estrogen receptors alpha and beta on MCF-7 sensitivity to the cytotoxic action of TNF and p53 activity. *Oncogene* 24, 4789-4798.

Li, H.X., Han, M., Bernier, M., Zheng, B., Sun, S.G., Su, M., Zhang, R., Fu, J.R., and Wen, J.K. (2010). Kruppel-like factor 4 promotes differentiation by transforming growth factor-beta receptor-mediated Smad and p38 MAPK signaling in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 17846-17856.

Li, Q.Q., Xu, J.D., Wang, W.J., Cao, X.X., Chen, Q., Tang, F., Chen, Z.Q., Liu, X.P., and Xu, Z.D. (2009). Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 2657-2665.

Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., *et al.* (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 672-679.

Liang, X.H., Kleeman, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., and Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of virology* 72, 8586-8596.

Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews Immunology* 3, 361-370.

Lim, J., and Thiery, J.P. (2012). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* 139, 3471-3486.

Liu, K., Idoyaga, J., Charalambous, A., Fujii, S., Bonito, A., Mordoh, J., Wainstok, R., Bai, X.F., Liu, Y., and Steinman, R.M. (2005). Innate NKT lymphocytes confer superior adaptive immunity via tumor-capturing dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 202, 1507-1516.

Liu, S., and Wicha, M.S. (2010). Targeting breast cancer stem cells. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 4006-4012.

Liu, Y.N., Abou-Kheir, W., Yin, J.J., Fang, L., Hynes, P., Casey, O., Hu, D., Wan, Y., Seng, V., Sheppard-Tillman, H., *et al.* (2012). Critical and reciprocal regulation of KLF4 and SLUG in transforming growth factor beta-initiated prostate cancer epithelial-mesenchymal transition. *Molecular and cellular biology* 32, 941-953.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

Long, J., Zuo, D., and Park, M. (2005). Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin. *The Journal of biological chemistry* 280, 35477-35489.

Lonn, P., van der Heide, L.P., Dahl, M., Hellman, U., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2010). PARP-1 attenuates Smad-mediated transcription. *Molecular cell* 40, 521-532.

Lu, Z., Luo, R.Z., Lu, Y., Zhang, X., Yu, Q., Khare, S., Kondo, S., Kondo, Y., Yu, Y., Mills, G.B., *et al.* (2008). The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *The Journal of clinical investigation* 118, 3917-3929.

Lugini, L., Matarrese, P., Tinari, A., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Gentile, M., Luciani, F., Parmiani, G., Rivoltini, L., *et al.* (2006). Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells. *Cancer research* 66, 3629-3638.

Lyubchenko, T.A., Wurth, G.A., and Zweifach, A. (2001). Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. *Immunity* 15, 847-859.

Ma, J.S., Haydar, T.F., and Radoja, S. (2008). Protein kinase C delta localizes to secretory lysosomes in CD8+ CTL and directly mediates TCR signals leading to granule exocytosis-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 181, 4716-4722.

Ma, L., Reinhardt, F., Pan, E., Soutschek, J., Bhat, B., Marcusson, E.G., Teruya-Feldstein, J., Bell, G.W., and Weinberg, R.A. (2010). Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nature biotechnology* 28, 341-347.

Ma, L., and Weinberg, R.A. (2008). MicroRNAs in malignant progression. *Cell Cycle* 7, 570-572.

Macintosh, R.L., Timpson, P., Thorburn, J., Anderson, K.I., Thorburn, A., and Ryan, K.M. (2012). Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model. *Cell Cycle* 11, 2022-2029.

Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., *et al.* (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO journal* 26, 2527-2539.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhardt, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., *et al.* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.

Mani, S.A., Yang, J., Brooks, M., Schwaninger, G., Zhou, A., Miura, N., Kutok, J.L., Hartwell, K., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10069-10074.

Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., and Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Advances in immunology* 74, 181-273.

Marotta, L.L., Almendro, V., Marusyk, A., Shipitsin, M., Schemme, J., Walker, S.R., Bloushtain-Qimron, N., Kim, J.J., Choudhury, S.A., Maruyama, R., *et al.* (2011). The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *The Journal of clinical investigation* 121, 2723-2735.

Martin, T.A., Goyal, A., Watkins, G., and Jiang, W.G. (2005). Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Annals of surgical oncology* 12, 488-496.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., *et al.* (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062-1075.

McCarthy, R.A., and Hay, E.D. (1991). Collagen I, laminin, and tenascin: ultrastructure and correlation with avian neural crest formation. *The International journal of developmental biology* 35, 437-452.

McCoy, E.L., Iwanaga, R., Jedlicka, P., Abbey, N.S., Chodosh, L.A., Heichman, K.A., Welm, A.L., and Ford, H.L. (2009). Six1 expands the mouse mammary epithelial stem/progenitor cell pool and induces mammary tumors that undergo epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 2663-2677.

McDermott, S.P., and Wicha, M.S. (2010). Targeting breast cancer stem cells. *Molecular oncology* 4, 404-419.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1999). Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 64, 429-435.

Meijer, A.J., and Codogno, P. (2007). AMP-activated protein kinase and autophagy. *Autophagy* 3, 238-240.

Melchor, L., and Smalley, M.J. (2008). Highway to heaven: mammary gland development and differentiation. *Breast cancer research : BCR* 10, 305.

Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T., Codogno, P., and Meijer, A.J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 281, 34870-34879.

Mellemkjaer, L., Friis, S., Olsen, J.H., Scelo, G., Hemminki, K., Tracey, E., Andersen, A., Brewster, D.H., Pukkala, E., McBride, M.L., *et al.* (2006). Risk of second cancer among women with breast cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 118, 2285-2292.

Menasche, G., Feldmann, J., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2005). Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunological reviews* 203, 165-179.

Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., *et al.* (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nature genetics* 25, 173-176.

Menrad, H., Werno, C., Schmid, T., Copanaki, E., Deller, T., Dehne, N., and Brune, B. (2010). Roles of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) versus HIF-2alpha in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology* 51, 2183-2192.

Metkar, S.S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S.M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J.A., and Froelich, C.J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16, 417-428.

Micalizzi, D.S., Christensen, K.L., Jedlicka, P., Coletta, R.D., Baron, A.E., Harrell, J.C., Horwitz, K.B., Billheimer, D., Heichman, K.A., Welm, A.L., *et al.* (2009). The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling. *The Journal of clinical investigation* 119, 2678-2690.

Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 15, 117-134.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development* 21, 2861-2873.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* 152, 657-668.

Molldrem, J.J., Lee, P.P., Kant, S., Wieder, E., Jiang, W., Lu, S., Wang, C., and Davis, M.M. (2003). Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells. *The Journal of clinical investigation* 111, 639-647.

Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.

Monu, N., and Frey, A.B. (2007). Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8+ tumor-infiltrating T cells. *Cancer research* 67, 11447-11454.

Moody, S.E., Perez, D., Pan, T.C., Sarkisian, C.J., Portocarrero, C.P., Sterner, C.J., Notorfrancesco, K.L., Cardiff, R.D., and Chodosh, L.A. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer cell* 8, 197-209.

Moodycliffe, A.M., Nghiem, D., Clydesdale, G., and Ullrich, S.E. (2000). Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nature immunology* 1, 521-525.

Morel, A.P., Lievre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one* 3, e2888.

Moreno-Bueno, G., Portillo, F., and Cano, A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* 27, 6958-6969.

Mrass, P., Takano, H., Ng, L.G., Daxini, S., Lasaro, M.O., Iparraguirre, A., Cavanagh, L.L., von Andrian, U.H., Ertl, H.C., Haydon, P.G., *et al.* (2006). Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 2749-2761.

Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J., and Ahmed, R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8, 177-187.

Nagata, Y., Furugen, R., Hiasa, A., Ikeda, H., Ohta, N., Furukawa, K., Nakamura, H., Furukawa, K., Kanematsu, T., and Shiku, H. (1997). Peptides derived from a wild-type murine proto-oncogene c-erbB-2/HER2/neu can induce CTL and tumor suppression in syngeneic hosts. *J Immunol* 159, 1336-1343.

Nakashima, M., Sonoda, K., and Watanabe, T. (1999). Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nature medicine* 5, 938-942.

Nara, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell structure and function* 27, 29-37.

Neeft, M., Wieffer, M., de Jong, A.S., Negroiu, G., Metz, C.H., van Loon, A., Griffith, J., Krijgsveld, J., Wulffraat, N., Koch, H., *et al.* (2005). Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells. *Molecular biology of the cell* 16, 731-741.

Nguyen, V.H., Shashidhar, S., Chang, D.S., Ho, L., Kambham, N., Bachmann, M., Brown, J.M., and Negrin, R.S. (2008). The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood* 111, 945-953.

Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., *et al.* (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 5367-5374.

Nieto, M.A., Sargent, M.G., Wilkinson, D.G., and Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-839.

Nogales, E. (2001). Structural insight into microtubule function. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 30, 397-420.

Noman, M.Z., Janji, B., Kaminska, B., Van Moer, K., Pierson, S., Przanowski, P., Buart, S., Berchem, G., Romero, P., Mami-Chouaib, F., *et al.* (2011). Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer research* 71, 5976-5986.

Ohsumi, Y. (1997). [Autophagy in yeast, bulk protein degradation in the vacuole]. *Seikagaku The Journal of Japanese Biochemical Society* 69, 39-44.

Ohsumi, Y., Ohsumi, M., and Baba, M. (1993). [Autophagy in yeast]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme* 38, 46-52.

Okuda, H., Xing, F., Pandey, P.R., Sharma, S., Watabe, M., Pai, S.K., Mo, Y.Y., Iizumi-Gairani, M., Hirota, S., Liu, Y., *et al.* (2013). miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer research* 73, 1434-1444.

Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer research* 68, 3645-3654.

Ouelaa-Benslama, R., De Wever, O., Hendrix, A., Sabbah, M., Lambein, K., Land, D., Prevost, G., Bracke, M., Hung, M.C., Larsen, A.K., *et al.* (2012). Identification of a GalphaGbetagamma, AKT and PKCalpha signalome associated with invasive growth in two genetic models of human breast cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition. *International journal of oncology* 41, 189-200.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307, 1603-1609.

Pandiyan, P., Hegel, J.K., Krueger, M., Quandt, D., and Brunner-Weinzierl, M.C. (2007). High IFN-gamma production of individual CD8 T lymphocytes is controlled by CD152 (CTLA-4). *J Immunol* 178, 2132-2140.

Papandreou, I., Lim, A.L., Laderoute, K., and Denko, N.C. (2008). Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell death and differentiation* 15, 1572-1581.

Park, S.J., Nakagawa, T., Kitamura, H., Atsumi, T., Kamon, H., Sawa, S., Kamimura, D., Ueda, N., Iwakura, Y., Ishihara, K., *et al.* (2004). IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 173, 3844-3854.

Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development* 22, 894-907.

Passlick, B., Pantel, K., Kubuschok, B., Angstwurm, M., Neher, A., Thetter, O., Schweiberer, L., and Izbicki, J.R. (1996). Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: association with early lymphatic spread of tumour cells. *Eur J Cancer* 32A, 141-145.

Pattingre, S., Bauvy, C., and Codogno, P. (2003). Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 16667-16674.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927-939.

Peguet-Navarro, J., Sportouch, M., Popa, I., Berthier, O., Schmitt, D., and Portoukalian, J. (2003). Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 170, 3488-3494.

Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews Cancer* 7, 415-428.

Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International journal of developmental biology* 48, 365-375.

Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2005). Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell Cycle* 4, 1749-1752.

Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *The Journal of biological chemistry* 278, 21113-21123.

Pena, C., Garcia, J.M., Garcia, V., Silva, J., Dominguez, G., Rodriguez, R., Maximiano, C., Garcia de Herreros, A., Munoz, A., and Bonilla, F. (2006). The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *International journal of cancer Journal international du cancer* 119, 2098-2104.

Peoples, G.E., Goedegebuure, P.S., Smith, R., Linehan, D.C., Yoshino, I., and Eberlein, T.J. (1995). Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 432-436.

Perez-Moreno, M.A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M.A., and Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of biological chemistry* 276, 27424-27431.

Pericle, F., Giovarelli, M., Colombo, M.P., Ferrari, G., Musiani, P., Modesti, A., Cavallo, F., Di Pierro, F., Novelli, F., and Forni, G. (1994). An efficient Th2-type memory follows CD8+ lymphocyte-driven and eosinophil-mediated rejection of a spontaneous mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-4. *J Immunol* 153, 5659-5673.

Periyasamy-Thandavan, S., Jiang, M., Wei, Q., Smith, R., Yin, X.M., and Dong, Z. (2008). Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney international* 74, 631-640.

Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193.

Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.

Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F., Meijer, A.J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 992-998.

Pham, C.T., and Ley, T.J. (1999). Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8627-8632.

Phipps, A.I., Li, C.I., Kerlikowske, K., Barlow, W.E., and Buist, D.S. (2010). Risk factors for ductal, lobular, and mixed ductal-lobular breast cancer in a screening population. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19, 1643-1654.

Pipkin, M.E., and Lieberman, J. (2007). Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current opinion in immunology* 19, 301-308.

Platt, J.B. (1894). Ontogenetische differenzierung des ektoderms in necturus. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*.

Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer* 4, 71-78.

Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews Cancer* 9, 265-273.

Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., and Daidone, M.G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research* 65, 5506-5511.

Poo, W.J., Conrad, L., and Janeway, C.A., Jr. (1988). Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* 332, 378-380.

Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J., and Kroll, K.L. (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *The EMBO journal* 22, 2453-2462.

Potts, J.D., and Runyan, R.B. (1989). Epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart can be mediated, in part, by transforming growth factor beta. *Developmental biology* 134, 392-401.

Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 12, R68.

Pua, H.H., and He, Y.W. (2007). Maintaining T lymphocyte homeostasis: another duty of autophagy. *Autophagy* 3, 266-267.

Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., and Ansieau, S. (2006). A twist for survival and cancer progression. *British journal of cancer* 94, 13-17.

Qiao, Y., Jiang, X., Lee, S.T., Karuturi, R.K., Hooi, S.C., and Yu, Q. (2011). FOXQ1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human cancers. *Cancer research* 71, 3076-3086.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., *et al.* (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation* 112, 1809-1820.

Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., *et al.* (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123-127.

Radoja, S., Saio, M., Schaer, D., Koneru, M., Vukmanovic, S., and Frey, A.B. (2001). CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis. *J Immunol* 167, 5042-5051.

Raja, S.M., Wang, B., Dantuluri, M., Desai, U.R., Demeler, B., Spiegel, K., Metkar, S.S., and Froelich, C.J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *The Journal of biological chemistry* 277, 49523-49530.

Raymond, J.S., and Hogue, C.J. (2006). Multiple primary tumours in women following breast cancer, 1973-2000. *British journal of cancer* 94, 1745-1750.

Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 192, 295-302.

Reddy, A., Caler, E.V., and Andrews, N.W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106, 157-169.

Reggiori, F., Shintani, T., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2005). Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* 1, 101-109.

Reilly, R.T., Gottlieb, M.B., Ercolini, A.M., Machiels, J.P., Kane, C.E., Okoye, F.I., Muller, W.J., Dixon, K.H., and Jaffee, E.M. (2000). HER-2/neu is a tumor rejection target in tolerized HER-2/neu transgenic mice. *Cancer research* 60, 3569-3576.

Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., and Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nature immunology* 2, 925-931.

Romero, P., Valmori, D., Pittet, M.J., Zippelius, A., Rimoldi, D., Levy, F., Dutoit, V., Ayyoub, M., Rubio-Godoy, V., Michielin, O., *et al.* (2002). Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunological reviews* 188, 81-96.

Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M.J., Touvrey, C., Iancu, E.M., Corthesy, P., Devedre, E., Speiser, D.E., and Rufer, N. (2007). Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 178, 4112-4119.

Rosette, C., Roth, R.B., Oeth, P., Braun, A., Kammerer, S., Ekblom, J., and Denissenko, M.F. (2005). Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26, 943-950.

Roussos, E.T., Keckesova, Z., Haley, J.D., Epstein, D.M., Weinberg, R.A., and Condeelis, J.S. (2010). AACR special conference on epithelial-mesenchymal transition and cancer progression and treatment. *Cancer research* 70, 7360-7364.

Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 68, 320-344.

Ruan, K., Bao, S., and Ouyang, G. (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66, 2219-2230.

Rughetti, A., Pellicciotta, I., Biffoni, M., Backstrom, M., Link, T., Bennet, E.P., Clausen, H., Noll, T., Hansson, G.C., Burchell, J.M., *et al.* (2005). Recombinant tumor-associated MUC1 glycoprotein impairs the differentiation and function of dendritic cells. *J Immunol* 174, 7764-7772.

Sabbah, M., Prunier, C., Ferrand, N., Megalophonos, V., Lambein, K., De Wever, O., Nazaret, N., Lachuer, J., Dumont, S., and Redeuilh, G. (2011). CCN5, a novel transcriptional repressor of the transforming growth factor beta signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 31, 1459-1469.

Saftig, P., Beertsen, W., and Eskelinen, E.L. (2008). LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy* 4, 510-512.

Salazar-Onfray, F., Charo, J., Petersson, M., Frelund, S., Noffz, G., Qin, Z., Blankenstein, T., Ljunggren, H.G., and Kiessling, R. (1997). Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10. *J Immunol* 159, 3195-3202.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.

Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S.M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., and Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer research* 68, 989-997.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal* 17, 1675-1687.

Scheel, C., and Weinberg, R.A. (2011). Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells? *International journal of cancer Journal international du cancer* 129, 2310-2314.

Schuler, T., and Blankenstein, T. (2003). Cutting edge: CD8⁺ effector T cells reject tumors by direct antigen recognition but indirect action on host cells. *J Immunol* 170, 4427-4431.

Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84-88.

Shao, Y., Gao, Z., Marks, P.A., and Jiang, X. (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 18030-18035.

Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R.K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C.H., Goulet, R., Jr., Badve, S., and Nakshatri, H. (2006). CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast cancer research : BCR* 8, R59.

Shi, Y., Sawada, J., Sui, G., Affar el, B., Whetstine, J.R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M.P., Nakatani, Y., and Shi, Y. (2003). Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* 422, 735-738.

Shimono, Y., Zabala, M., Cho, R.W., Lobo, N., Dalerba, P., Qian, D., Diehn, M., Liu, H., Panula, S.P., Chiao, E., *et al.* (2009). Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 138, 592-603.

Shresta, S., Pham, C.T., Thomas, D.A., Graubert, T.A., and Ley, T.J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Current opinion in immunology* 10, 581-587.

Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., and Allavena, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42, 717-727.

Siegel, R.M., Chan, F.K., Chun, H.J., and Lenardo, M.J. (2000). The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 1, 469-474.

Silzle, T., Kreutz, M., Dobler, M.A., Brockhoff, G., Knuechel, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2003). Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *European journal of immunology* 33, 1311-1320.

Simonsen, A., and Stenmark, H. (2008). Self-eating from an ER-associated cup. *The Journal of cell biology* 182, 621-622.

Singh, R., and Paterson, Y. (2006). Vaccination strategy determines the emergence and dominance of CD8+ T-cell epitopes in a FVB/N rat HER-2/neu mouse model of breast cancer. *Cancer research* 66, 7748-7757.

Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 344, 783-792.

Soini, Y., Tuhkanen, H., Sironen, R., Virtanen, I., Kataja, V., Auvinen, P., Mannermaa, A., and Kosma, V.M. (2011). Transcription factors *zeb1*, *twist* and *snail* in breast carcinoma. *BMC cancer* 11, 73.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10869-10874.

Spaderna, S., Schmalhofer, O., Wahlbuhl, M., Dimmler, A., Bauer, K., Sultan, A., Hlubek, F., Jung, A., Strand, D., Eger, A., *et al.* (2008). The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer research* 68, 537-544.

Spiotto, M.T., Rowley, D.A., and Schreiber, H. (2004). Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nature medicine* 10, 294-298.

St Johnston, D., and Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* 141, 757-774.

Stark, A., Kapke, A., Schultz, D., Brown, R., Linden, M., and Raju, U. (2008). Advanced stages and poorly differentiated grade are associated with an increased risk of HER2/neu positive breast carcinoma only in White women: findings from a prospective cohort study of African-American and White-American women. *Breast cancer research and treatment* 107, 405-414.

Steinman, R.M. (2003). Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 111, 675-697.

Stemmer, V., de Craene, B., Berx, G., and Behrens, J. (2008). Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin. *Oncogene* 27, 5075-5080.

Stinchcombe, J.C., Barral, D.C., Mules, E.H., Booth, S., Hume, A.N., Machesky, L.M., Seabra, M.C., and Griffiths, G.M. (2001a). Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of cell biology* 152, 825-834.

Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G.M. (2001b). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-761.

Stinchcombe, J.C., and Griffiths, G.M. (2007). Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of cell and developmental biology* 23, 495-517.

Stingl, J., and Caldas, C. (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature reviews Cancer* 7, 791-799.

Strasser, A., Jost, P.J., and Nagata, S. (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30, 180-192.

Strobl, H., and Knapp, W. (1999). TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur I*, 1283-1290.

Sutton, V.R., Waterhouse, N.J., Browne, K.A., Sedelies, K., Ciccone, A., Anthony, D., Koskinen, A., Mullbacher, A., and Trapani, J.A. (2007). Residual active granzyme B in cathepsin C-null lymphocytes is sufficient for perforin-dependent target cell apoptosis. *The Journal of cell biology* 176, 425-433.

Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO journal* 20, 5971-5981.

Tachimori, A., Yamada, N., Sakate, Y., Yashiro, M., Maeda, K., Ohira, M., Nishino, H., and Hirakawa, K. (2005). Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 41, 1802-1810.

Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H.D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J.U., Cheng, J.Q., Mule, J.J., *et al.* (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology* 9, 1142-1151.

Takata, H., and Takiguchi, M. (2006). Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *J Immunol* 177, 4330-4340.

Tan, T.T., and Coussens, L.M. (2007). Humoral immunity, inflammation and cancer. *Current opinion in immunology* 19, 209-216.

Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Cheh, C.W., Farkas, A., Loughran, P., Hoppe, G., Bianchi, M.E., Tracey, K.J., Zeh, H.J., 3rd, *et al.* (2010). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *The Journal of cell biology* 190, 881-892.

Tarin, D., Thompson, E.W., and Newgreen, D.F. (2005). The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer research* 65, 5996-6000; discussion 6000-5991.

Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., *et al.* (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature cell biology* 10, 676-687.

Tazawa, H., Yano, S., Yoshida, R., Yamasaki, Y., Sasaki, T., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Ouchi, M., Onishi, T., Uno, F., *et al.* (2012). Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 131, 2939-2950.

Tchernev, V.T., Mansfield, T.A., Giot, L., Kumar, A.M., Nandabalan, K., Li, Y., Mishra, V.S., Detter, J.C., Rothberg, J.M., Wallace, M.R., *et al.* (2002). The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins. *Mol Med* 8, 56-64.

Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D.D., Carbone, D.P., Paul, W.E., and Berzofsky, J.A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nature immunology* 1, 515-520.

Terabe, M., Swann, J., Ambrosino, E., Sinha, P., Takaku, S., Hayakawa, Y., Godfrey, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Smyth, M.J., and Berzofsky, J.A. (2005). A nonclassical non-Valpha4Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *The Journal of experimental medicine* 202, 1627-1633.

Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2008). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell death and differentiation* 15, 3-12.

Thiery, J., Abouzahr, S., Dorothee, G., Jalil, A., Richon, C., Vergnon, I., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2005). p53 potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways. *J Immunol* 174, 871-878.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 131-142.

Thorburn, J., Frankel, A.E., and Thorburn, A. (2009). Regulation of HMGB1 release by autophagy. *Autophagy* 5, 247-249.

Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J., John, S., and Taams, L.S. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19446-19451.

Tjiu, J.W., Chen, J.S., Shun, C.T., Lin, S.J., Liao, Y.H., Chu, C.Y., Tsai, T.F., Chiu, H.C., Dai, Y.S., Inoue, H., *et al.* (2009). Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *The Journal of investigative dermatology* 129, 1016-1025.

Tojo, M., Hamashima, Y., Hanyu, A., Kajimoto, T., Saitoh, M., Miyazono, K., Node, M., and Imamura, T. (2005). The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer science* 96, 791-800.

Trapani, J.A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome biology* 2, REVIEWS3014.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews Immunology* 2, 735-747.

Trautmann, A., and Randriamampita, C. (2003). Initiation of TCR signalling revisited. *Trends in immunology* 24, 425-428.

Trelstad, R.L., Hay, E.D., and Revel, J.D. (1967). Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Developmental biology* 16, 78-106.

Trentham-Dietz, A., Newcomb, P.A., Nichols, H.B., and Hampton, J.M. (2007). Breast cancer risk factors and second primary malignancies among women with breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 105, 195-207.

Tschopp, J., Masson, D., and Stanley, K.K. (1986). Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature* 322, 831-834.

Turcotte, S., Chan, D.A., Sutphin, P.D., Hay, M.P., Denny, W.A., and Giaccia, A.J. (2008). A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer cell* 14, 90-102.

Valdes, F., Alvarez, A.M., Locascio, A., Vega, S., Herrera, B., Fernandez, M., Benito, M., Nieto, M.A., and Fabregat, I. (2002). The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. *Molecular cancer research : MCR* 1, 68-78.

van der Horst, P.H., Wang, Y., Vandenput, I., Kuhne, L.C., Ewing, P.C., van Ijcken, W.F., van der Zee, M., Amant, F., Burger, C.W., and Blok, L.J. (2012). Progesterone inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in endometrial cancer. *PloS one* 7, e30840.

van der Merwe, P.A., Bodian, D.L., Daenke, S., Linsley, P., and Davis, S.J. (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *The Journal of experimental medicine* 185, 393-403.

Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M.L. (2006). T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* 25, 117-127.

Vega, S., Morales, A.V., Ocana, O.H., Valdes, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & development* 18, 1131-1143.

Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., and Rocha, B. (2000). Response of naive and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature immunology* 1, 47-53.

Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J.H., and Raman, V. (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 367, 235-241.

Veugelers, K., Motyka, B., Goping, I.S., Shostak, I., Sawchuk, T., and Bleackley, R.C. (2006). Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Molecular biology of the cell* 17, 623-633.

Vignali, D. (2008). How many mechanisms do regulatory T cells need? *European journal of immunology* 38, 908-911.

Vincent, T., Neve, E.P., Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., *et al.* (2009). A SNAI1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nature cell biology* 11, 943-950.

Vitale, M., Rezzani, R., Rodella, L., Zauli, G., Grigolato, P., Cadei, M., Hicklin, D.J., and Ferrone, S. (1998). HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer research* 58, 737-742.

Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M., Fiers, W., and van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-119.

Voskoboinik, I., and Trapani, J.A. (2006). Addressing the mysteries of perforin function. *Immunology and cell biology* 84, 66-71.

Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., *et al.* (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature medicine* 10, 48-54.

Wang, X., Nie, J., Zhou, Q., Liu, W., Zhu, F., Chen, W., Mao, H., Luo, N., Dong, X., and Yu, X. (2008). Downregulation of Par-3 expression and disruption of Par complex integrity by TGF-beta during the process of epithelial to mesenchymal transition in rat proximal epithelial cells. *Biochimica et biophysica acta* 1782, 51-59.

Wang, Z., Wilson, W.A., Fujino, M.A., and Roach, P.J. (2001). Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Molecular and cellular biology* 21, 5742-5752.

Ward, D.M., Griffiths, G.M., Stinchcombe, J.C., and Kaplan, J. (2000). Analysis of the lysosomal storage disease Chediak-Higashi syndrome. *Traffic* 1, 816-822.

Wei, Y., Sinha, S., and Levine, B. (2008). Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* 4, 949-951.

White, E., and DiPaola, R.S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 5308-5316.

Whiteman, E.L., Liu, C.J., Fearon, E.R., and Margolis, B. (2008). The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene* 27, 3875-3879.

Wik, E., Raeder, M.B., Krakstad, C., Trovik, J., Birkeland, E., Hoivik, E.A., Mjos, S., Werner, H.M., Mannelqvist, M., Stefansson, I.M., *et al.* (2013). Lack of estrogen receptor-alpha is associated with epithelial-mesenchymal transition and PI3K alterations in endometrial carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 1094-1105.

Winter, H., van den Engel, N.K., Ruttinger, D., Schmidt, J., Schiller, M., Poehlein, C.H., Lohe, F., Fox, B.A., Jauch, K.W., Hatz, R.A., *et al.* (2007). Therapeutic T cells induce tumor-directed chemotaxis of innate immune cells through tumor-specific secretion of chemokines and stimulation of B16BL6 melanoma to secrete chemokines. *Journal of translational medicine* 5, 56.

Wong, E.T., and Tergaonkar, V. (2009). Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 116, 451-465.

Woodland, D.L., and Kohlmeier, J.E. (2009). Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nature reviews Immunology* 9, 153-161.

Wu, K., and Bonavida, B. (2009). The activated NF-kappaB-Snail-RKIP circuitry in cancer regulates both the metastatic cascade and resistance to apoptosis by cytotoxic drugs. *Critical reviews in immunology* 29, 241-254.

Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J.F., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer research* 67, 2649-2656.

Yang, A.D., Camp, E.R., Fan, F., Shen, L., Gray, M.J., Liu, W., Somcio, R., Bauer, T.W., Wu, Y., Hicklin, D.J., *et al.* (2006a). Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer research* 66, 46-51.

Yang, A.D., Fan, F., Camp, E.R., van Buren, G., Liu, W., Somcio, R., Gray, M.J., Cheng, H., Hoff, P.M., and Ellis, L.M. (2006b). Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 4147-4153.

Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell* 14, 818-829.

Yang, M.H., Wu, M.Z., Chiou, S.H., Chen, P.M., Chang, S.Y., Liu, C.J., Teng, S.C., and Wu, K.J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nature cell biology* 10, 295-305.

Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell'antonio, G., *et al.* (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & development* 25, 717-729.

Yang, X., Chang, H.Y., and Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell* 1, 319-325.

Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology* 22, 124-131.

Young, A.R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F., Tavares, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., *et al.* (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & development* 23, 798-803.

Young, J.D., Cohn, Z.A., and Podack, E.R. (1986). The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science* 233, 184-190.

Yu, Y., Yang, L., Zhao, M., Zhu, S., Kang, R., Vernon, P., Tang, D., and Cao, L. (2012). Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* 26, 1752-1760.

Yue, W., Hamai, A., Tonelli, G., Bauvy, C., Nicolas, V., Tharinger, H., Codogno, P., and Mehrpour, M. (2013). Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like/progenitor cells interferes with their maintenance. *Autophagy* 9, 714-729.

Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., *et al.* (2005). Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer research* 65, 3044-3048.

Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampe, R., Lazis, S., and Hammerschmidt, W. (1997). Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 90, 2390-2397.

Zhai, H., Song, B., Xu, X., Zhu, W., and Ju, J. (2013). Inhibition of autophagy and tumor growth in colon cancer by miR-502. *Oncogene* 32, 1570-1579.

Zhang, M., Park, S.M., Wang, Y., Shah, R., Liu, N., Murmann, A.E., Wang, C.R., Peter, M.E., and Ashton-Rickardt, P.G. (2006). Serine protease inhibitor 6 protects cytotoxic T cells from self-inflicted injury by ensuring the integrity of cytotoxic granules. *Immunity* 24, 451-461.

Zhang, Q., Piston, D.W., and Goodman, R.H. (2002). Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science* 295, 1895-1897.

Zhao, L.J., Subramanian, T., Zhou, Y., and Chinnadurai, G. (2006). Acetylation by p300 regulates nuclear localization and function of the transcriptional corepressor CtBP2. *The Journal of biological chemistry* 281, 4183-4189.

Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nature cell biology* 6, 931-940.

Zhou, G., Dada, L.A., Wu, M., Kelly, A., Trejo, H., Zhou, Q., Varga, J., and Sznajder, J.I. (2009). Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 297, L1120-1130.

Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Li, B., Chen, Y., Ren, X., Liu, C.G., and Yang, J.M. (2009). Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy* 5, 816-823.

Zoppino, F.C., Militello, R.D., Slavin, I., Alvarez, C., and Colombo, M.I. (2010). Autophagosome formation depends on the small GTPase Rab1 and functional ER exit sites. *Traffic* 11, 1246-1261.

Zou, Z., Wu, L., Ding, H., Wang, Y., Zhang, Y., Chen, X., Chen, X., Zhang, C.Y., Zhang, Q., and Zen, K. (2012). MicroRNA-30a sensitizes tumor cells to cis-platinum via suppressing beclin 1-mediated autophagy. *The Journal of biological chemistry* 287, 4148-4156.

Résumé

L'immunologie anti-tumorale et l'immunothérapie ont connu dernièrement de grandes avancées avec la mise en évidence du processus d'immuno-surveillance et le développement de plusieurs approches vaccinales. Il n'en demeure pas moins que l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale se traduit peu par l'éradication de la tumeur. Comme phénomène dynamique et interactif, la réponse cytotoxique anti-tumorale implique les effecteurs cytotoxiques et les cibles tumorales; pourtant, le microenvironnement tumoral et sa plasticité influent largement sur l'efficacité de celle-ci. Avec l'appui de récentes données expérimentales, il apparaît crucial de prendre en compte la susceptibilité tumorale à la lyse par les effecteurs cytotoxiques anti-tumoraux, notamment les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs), et plus particulièrement dans un contexte de plasticité cellulaire. Ainsi, le principal objectif de mes travaux de thèse est de saisir le rôle de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (EMT) dans la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les CTLs dans des modèles cellulaires de cancer du sein. Nos résultats montrent que l'EMT est capable d'induire une diminution de la susceptibilité des cellules mésenchymateuses à la lyse spécifique. Elle engage de ce fait de multiples acteurs. Tout d'abord, dans les deux modèles d'étude, il s'avère que l'EMT est capable de réguler négativement l'expression de la molécule HLA-A2. Ensuite, dans le premier modèle expérimental, nous avons établi que l'EMT induit une altération de la signalisation au niveau de la synapse immunologique. De plus, le régulateur de l'autophagie, Becline 1, joue un rôle crucial dans l'induction de la diminution de la sensibilité à la lyse par les lymphocytes T-CD8⁺ suite à l'induction de l'EMT. Dans le deuxième modèle d'étude, le mécanisme mis en jeu par l'EMT pour réguler la susceptibilité des cellules mésenchymateuses à la lyse par les CTLs se manifeste dans l'induction du facteur de transcription inducteur des propriétés de cellules souches cancéreuses, le KLF4 ainsi que via la régulation négative de l'expression du miR-7. Ensemble, ces résultats élucident de nouveaux mécanismes d'échappement des cellules tumorales malignes à la lyse par les lymphocytes T-CD8⁺ suite à l'induction de l'EMT. Cette étude soutient ainsi l'importance du ciblage des facteurs de transcription inducteurs de l'EMT et responsables de la plasticité cellulaire afin de neutraliser leur fonction. Cela pourrait aider à construire une nouvelle stratégie pour mieux contrôler l'échappement des cellules tumorales invasives à la lyse spécifique et *in fine* pour garantir une immunothérapie plus efficace contre le cancer.

Mots clés : EMT, CTLs, HLA-A2, Becline-1, KLF-4, miR-7.

Abstract

The anti-tumor immunology and immunotherapy have recently undergone major breakthroughs, with the identification of immune surveillance process and the development of several vaccine approaches. However, the fact remains that the induction of an antitumor immune response is still not effective enough. Certainly, the antitumor cytotoxic response is a dynamic and interactive phenomenon, involving cytotoxic effectors and tumor targets, but its effectiveness is considerably influenced by the tumor microenvironment and its plasticity. Recent studies support the importance of taking into account the tumor susceptibility to lysis by anti-tumor cytotoxic effectors, notably Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs), especially in a context of cellular plasticity. On the grounds of these studies, this research aims at understanding the role of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in the susceptibility of tumor cells to CTLs mediated lysis in different models of breast cell carcinoma. Our results reveal that EMT is able to induce a decrease in the susceptibility of mesenchymal cells to specific lysis. It calls therefore multiple actors. First, in both study models, it turns out that the EMT is able to downregulate the expression of HLA-A2 molecule. Then, in the first experimental model, we show that EMT induces an alteration of signalling at the immunological synapse. Moreover, the regulator of autophagy, Beclin 1, plays a crucial role in the induction of reduced susceptibility to lysis by T-CD8⁺ lymphocytes following induction of EMT. In the second experimental model, we show that the mechanisms used by EMT to regulate the susceptibility of mesenchymal cells to lysis by CTLs involve the induction of the transcription factor inducing cancer stem cells properties, KLF4, as well as the downregulation of miR-7 expression. Together, these results shed light on new mechanisms used by malignant tumor cells to escape to lysis by T-CD8⁺ lymphocytes following the induction of EMT. Thus, this study advocates the importance of targeting transcription factors, which are inducers of EMT and responsible for cellular plasticity, in order to neutralize their function. These insights may prove useful for the development of new strategies aimed at better controlling the escape of invasive tumor cells to specific lysis, and ultimately ensuring a more effective immunotherapy against cancer.

Keywords: EMT, CTLs, HLA-A2, Beclin-1, KLF-4, miR-7.