



**HAL**  
open science

# Rôle du stress hypoxique dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale des lymphocytes "Natural Killer"

Guy Berchem

► **To cite this version:**

Guy Berchem. Rôle du stress hypoxique dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale des lymphocytes "Natural Killer". Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T105 . tel-01127317

**HAL Id: tel-01127317**

**<https://theses.hal.science/tel-01127317>**

Submitted on 7 Mar 2015

**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.

UNIVERSITE PARIS-SUD  
Ecole Doctorale de Cancérologie

Laboratoire d'Immunologie des tumeurs humaines  
Interaction effecteurs cytotoxiques - système tumoral – INSERM 753

**Thèse**  
**Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris-Sud**

Présentée par:  
**Guy Berchem**

**Rôle du stress hypoxique dans la régulation de la  
réponse immunitaire anti-tumorale des  
lymphocytes "Natural Killer"**

*Soutenue le 22 décembre 2014 devant le jury composé des :*

Professeur Jean FEUNTEUN	Président
Professeur Arsène BURNY	Rapporteur
Docteur Emmanuelle LIAUDET-COOPMAN	Rapporteur
Professeur Ahmad AWADA	Examineur
Professeur Pierre BUSSON	Examineur
Docteur Pierre SAVAGNER	Examineur
Professeur Salem CHOUAIB	Directeur de thèse

## Résumé

---

Le microenvironnement tumoral, et notamment le stress hypoxique, joue un rôle immunosuppresseur permettant l'échappement des cellules tumorales à la surveillance du système immunitaire. Des études récentes ont montré que l'échange de microvésicules (MVs) entre les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire peut être responsable de l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur. Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet des MVs issues des cellules tumorales hypoxiques sur la cytotoxicité des cellules «Natural Killer» (NKs). Nos résultats démontrent clairement que les cellules NKs sont capables d'internaliser les MVs issues des cellules tumorales normoxiques et hypoxiques. Cependant, seules les MVs hypoxiques sont capables de diminuer significativement la cytotoxicité des cellules NKs. Ainsi, nous avons déterminé que les MVs dérivées des cellules tumorales hypoxiques séquestrent deux immunomodulateurs, le TGF- $\beta$  et le miR-23a. Nous avons montré que le transfert de TGF- $\beta$  et miR-23a aux cellules NKs était responsable de la diminution respective de l'expression du récepteur activateur NKG2D à leur surface et de la protéine membranaire associée aux lysosomes (LAMP-1/CD107a) impliquée dans la dégranulation des granules cytotoxiques.

Dans la deuxième partie de cette étude nous avons montré que les cellules tumorales soumises à un stress hypoxique étaient capables de déjouer un système immunitaire fonctionnel et d'échapper ainsi à la surveillance immunitaire des cellules NKs. En effet, nos résultats ont clairement démontré que la résistance des cellules tumorales hypoxiques à la lyse par les cellules NKs n'était pas liée à un défaut de reconnaissance, mais plutôt à l'activation d'un mécanisme de résistance intrinsèque dans les cellules tumorales. Ce mécanisme de résistance implique l'activation de l'autophagie qui opère dans les cellules tumorales pour dégrader le granzyme B, une protéase à sérine sécrétée par les cellules NKs dont l'internalisation par les cellules tumorales cibles est nécessaire pour induire leur mort. Les expériences d'imagerie cellulaire combinées à des approches biochimiques ont confirmé que le niveau de granzyme B dans les cellules tumorales hypoxiques était significativement moins élevé par rapport à celui des cellules tumorales normoxiques. L'analyse de la distribution subcellulaire de granzyme B révèle qu'il est majoritairement présent dans les endosomes et les autophagosomes des cellules tumorales hypoxiques. Ces résultats suggèrent fortement que le granzyme B est destiné à être dégradé par autophagie dans les cellules tumorales hypoxiques. En effet, l'inhibition génétique et pharmacologique de l'autophagie dans les cellules tumorales hypoxiques était suffisante pour contrecarrer la dégradation de granzyme B et ainsi restaurer la sensibilité des cellules tumorales hypoxiques à la lyse par les cellules NKs. Nos résultats ont clairement établi que l'inhibition de l'autophagie pouvait améliorer la réponse immunitaire antitumorale dépendante des cellules NK. Nous avons validé ce concept *in vivo* chez la souris en utilisant deux modèles syngéniques de cancer du sein et de mélanome.

L'ensemble de nos travaux indiquent clairement que le stress hypoxique, qui est une caractéristique majeure du microenvironnement tumoral, peut favoriser l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur par plusieurs mécanismes qui ne s'excluent pas mutuellement. En effet, le stress hypoxique modifie les caractéristiques des cellules tumorales et active des mécanismes de résistance à la surveillance immunitaire. De plus, les cellules tumorales modifiées peuvent éduquer et exporter leur phénotype hypoxique aux cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement afin d'affaiblir leur pouvoir cytotoxique. Nos résultats ouvrent ainsi la voie à la mise en place de nouvelles applications cliniques en immunothérapie anticancéreuse basées sur la réactivation des lymphocytes cytotoxiques et l'inhibition simultanée de l'autophagie.

## Remerciements

---

J'aimerais d'abord remercier ma famille, mon épouse Manon et mes enfants Antoine et Maxime pour leur patience et leur soutien continu pendant les nombreuses heures de travail pendant lesquelles je n'étais pas disponible pour eux. J'aimerai également remercier Manon pour l'aide technique qu'elle m'a apportée dans ce travail.

J'aimerais remercier mon directeur de thèse le Professeur Salem Chouaib de m'avoir permis de travailler dans son équipe et pour les nombreuses discussions constructives et son soutien au cours de cette thèse. Sa gentillesse et ses connaissances m'ont toujours permis d'avancer dans la bonne direction.

Je remercie aussi très chaleureusement mon ami et l'adjoint de mon laboratoire le Docteur Bassam Janji pour son immense aide à tous les niveaux dans ce travail, et surtout pour son soutien et ses encouragements continus même dans des moments difficiles.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Jean Feunteun qui a accepté de présider la soutenance de ma thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Arsène Burny et Madame le Docteur Emmanuelle Liaudet-Coopman et à Messieurs les Professeurs Ahmad Awada, Pierre Busson et Pierre Savagner qui ont accepté de me consacrer de leurs temps précieux, et m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Muhammad Zaeem Noman pour l'aide scientifique et technique qu'il a bien voulu m'apporter tout au long de cette thèse

J'aimerai également remercier chaleureusement les collaborateurs de mon laboratoire au CRP-Santé, Joanna, Elodie, Etienne, Jérôme, Sandrine M, Sandrine P, Nassera, et Valérie, qui m'ont apporté une aide inestimable et qui m'ont supporté comme chef 😊.

Je remercie aussi mes collègues de travail en clinique, les Docteurs Caroline Duhem, Fernand Ries, Sigrid DeWilde, Laurent Plawny ainsi que le Prof Mario Dicato pour leur aide et leurs soutiens tout au long du chemin.

Finalement j'aimerai remercier mes parents, qui m'ont soutenu durant toutes mes études ainsi que ma carrière professionnelle et m'ont toujours permis et encouragés de poursuivre mes rêves.

# Table des Matières

Introduction.....	7
1. Généralités.....	8
2. Echappement à la surveillance immunitaire une caractéristique majeure du développement du cancer.....	9
3. Rôle du microenvironnement dans la progression tumorale.....	16
3.1. Le stress hypoxique.....	16
3.1.1 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).....	18
3.1.2 Régulation de l'activité de HIF-1.....	19
3.1.3 Les différents mécanismes activés par l'hypoxie dans les cellules tumorales.....	21
3.1.3.1 Hypoxie et la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT).....	21
3.1.3.2 Le stress hypoxique et le métabolisme glucidique.....	22
3.1.3.3 Hypoxie et cellules souches.....	22
3.1.3.4 Hypoxie et Micro-RNAs.....	23
3.2. L'autophagie.....	24
3.2.1 Mécanisme moléculaire de l'autophagie.....	25
3.2.2 Le rôle anti- et pro-tumoral de l'autophagie.....	28
3.2.3 Le mécanisme de l'activation de l'autophagie par le stress hypoxique.....	30
3.3. Le stress hypoxique et la réponse immunitaire anti-tumorale.....	32
3.3.1 Le rôle du microenvironnement tumoral dans la régulation des cellules immunitaires infiltrant la tumeur.....	34
3.3.2 Les cellules stromales d'origine fibroblastique.....	35
3.3.3 Les cellules stromales d'origine myéloïde.....	36
3.3.4 Les cellules Natural killer (NK).....	38
Rôle des microRNAs dans la régulation de NK.....	44
3.4. Les microvésicules tumorales.....	45
3.4.1 Rôle des microvésicules dans les métastases.....	47
3.4.2 Rôle des microvésicules dans la résistance aux médicaments anticancéreux.....	48

3.4.3	Rôle des microvésicules dans la réponse immunitaire et l'immunoévasion .....	49
3.4.4	Rôle des microvésicules dans la délivrance de médicaments .....	50
	But de l'étude .....	53
	Résultats .....	57
1.	Article 1: Hypoxic tumor-derived microvesicles alter natural killer cell cytotoxicity by a mechanism involving TGF- $\beta$ and miR23a transfer. ....	58
	Résumé de l'article 1 .....	59
2.	Article 2: Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia.....	90
	Résumé de l'article 2 .....	91
	Discussion générale .....	95
	Perspective .....	102
	Annexe .....	108
	Bibliographie.....	109

# Table des Figures

<b>FIGURE 1</b> : LES ALTERATIONS ESSENTIELLES IMPLIQUEES DANS LA TRANSFORMATION MALIGNNE .....	10
<b>FIGURE 2</b> : LES CARACTERISTIQUES EMERGENTES IMPLIQUEES DANS LA TRANSFORMATION MALIGNNE.....	11
<b>FIGURE 3</b> : LES DIFFERENTS GENES REGULES PAR HIF.....	18
<b>FIGURE 4</b> : LES DIFFERENTS DOMAINES DE HIF1A ET HIF1 $\beta$ .....	19
<b>FIGURE 5</b> : MECANISME DE REGULATION DE HIF .....	20
<b>FIGURE 6</b> : LES DIFFERENT FORMES D'AUTOPHAGIE .....	25
<b>FIGURE 7</b> : LE MECANISME MOLECULAIRE DE L'AUTOPHAGIE .....	27
<b>FIGURE 8</b> : MECANISME MOLECULAIRE DE L'INDUCTION D'AUTOPHAGIE PAR LE STRESS HYPOXIQUE .....	31
<b>FIGURE 9</b> : ROLE DE L'HYPOXIE DANS L'INDUCTION DE PHOSPHO-STAT3 ET LA REGULATION DE LA LYSE SPECIFIQUE PAR LES CTLs .....	33
<b>FIGURE 10</b> : ROLE DES CAF DANS LA REGULATION DES CELLULES NK.....	36
<b>FIGURE 11</b> : LES INTERACTIONS CELLULAIRES DANS LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	38
<b>FIGURE 12</b> : MECANISME D'INTERACTION ENTRE LES CELLULES TUMORALES ET LES NK.....	39
<b>FIGURE 13</b> : MECHANISM DE RECONNAISSANCE DES CELLULES NORMALES OU TUMORALES PAR LES NK.....	41

# Introduction



## **1. Généralités**

En dépit d'un quart de siècle de progrès rapides dans la recherche contre le cancer, il reste malheureusement, avec les maladies cardiovasculaires, la première cause de mortalité dans les pays développés et une cause de plus en plus importante de mortalité même dans les pays en voie de développement.

Au niveau mondial les chiffres d'incidence et de mortalité sont en nette augmentation, même si dans les pays industrialisés la mortalité semble stable, voire en léger déclin. Ceci est probablement dû en partie à un dépistage plus précoce mais également au développement de traitements plus efficaces.

Les raisons de l'augmentation des cancers dans les pays émergents comme l'Inde et la Chine, sont probablement liées au fait que le développement économique entraîne invariablement une sédentarisation ainsi que l'adoption d'un mode alimentaire plus propice au développement de cancers. De plus, le cancer étant une maladie de la personne d'âge mûr en général, l'augmentation de l'espérance de vie y est évidemment aussi impliquée.

Devant ce constat il reste néanmoins le fait que nos connaissances sur les mécanismes qui sont à la base des processus cancéreux ont énormément progressé en 30 ans. La meilleure compréhension des modes de division et de mort cellulaire ont très largement contribué au développement de nouvelles approches thérapeutiques, ou ont permis de comprendre le mode d'action des chimiothérapies classiques. Depuis une dizaine d'années, les stratégies thérapeutiques impliquant le système immunitaire ont enfin connu des succès thérapeutiques réels. En effet après une longue période marquée par des études cliniques négatives, l'immunothérapie a pu retrouver ses lettres de noblesse

essentiellement grâce à l'émergence des « immune checkpoint inhibitors » impliquant aussi bien l'activation du système immunitaire inné qu'adaptatif.

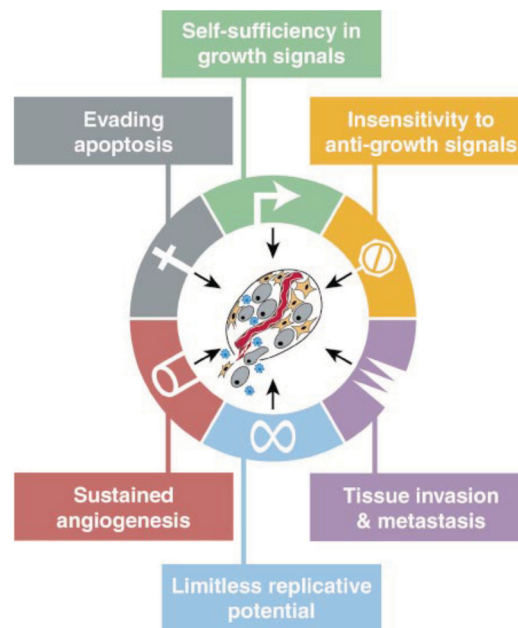
Il reste néanmoins d'énormes progrès à accomplir avant que l'approche immunitaire ne puisse être considérée comme curative, et ceci essentiellement en raison des nombreux mécanismes permettant aux cellules tumorales d'échapper à la surveillance immunitaire.

La présente thèse abordera quelques-uns de ces mécanismes impliquant le microenvironnement tumoral et notamment le stress hypoxique retrouvé dans la plupart des tumeurs, sur l'inactivation de la réponse immunitaire innée médiée par les cellules « Natural Killer » (NK).

## ***2. Echappement à la surveillance immunitaire une caractéristique majeure du développement du cancer***

La recherche sur le cancer a généré des connaissances à la fois riches et d'une extrême complexité. La conclusion de tous ces travaux est que le cancer est une maladie impliquant des changements dynamiques dans le génome. Cette conclusion repose essentiellement sur la découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans les cellules cancéreuses humaines et animales et sur leurs capacités à déclencher ou à réprimer des tumeurs dans des modèles expérimentaux. Il est actuellement bien établi que le développement d'une tumeur résulte d'une succession d'événements mutationnels et de modifications épigénétiques. Ainsi, le catalogue dressé à partir d'un génotypage vaste des tumeurs a permis d'identifier 6 altérations essentielles dans la physiologie des cellules (Hanahan and Weinberg, 2000) (**Figure 1**). Il semblerait que, collectivement, ces altérations dictent la transformation maligne des cellules tumorales:

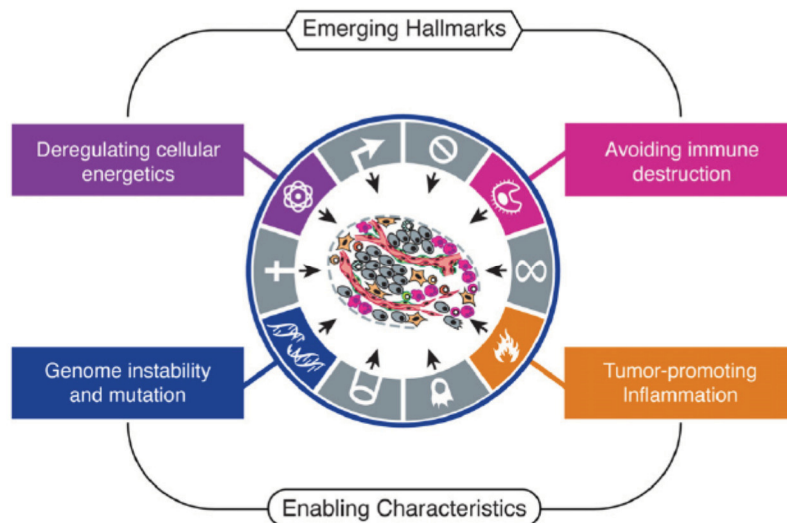
- 1) Une autosuffisance en signaux de croissance
- 2) Un échappement à la mort cellulaire programmée (apoptose)
- 3) Une résistance aux signaux inhibiteurs de croissance
- 4) Une angiogénèse accrue
- 5) Un potentiel répliatif sans limite
- 6) Une capacité invasive et métastatique au niveau des tissus.



**Figure 1** : Les Altérations essentielles impliquées dans la transformation maligne. (Hanahan and Weinberg, 2000)

Bien que chaque type de tumeur développe une stratégie mécanistique différente au cours de la transformation maligne, ces six altérations ont été retrouvées dans la plupart, voir dans tous les types de tumeurs humaines.

Se basant sur ces six caractéristiques majeures de la transformation maligne, Hanhan, Weinberg et d'autres ont étendu leurs réflexions (Hanahan and Coussens, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011) en rajoutant des caractéristiques émergentes qu'ils n'avaient pas considérées auparavant (**Figure 2**).



**Figure 2 :** Les caractéristiques émergentes impliquées dans la transformation maligne.

Un nombre croissant de résultats suggère que deux caractéristiques supplémentaires de cancers sont impliquées dans la pathogenèse de certains, et peut-être, tous les cancers. L'une concerne la possibilité de modifier ou de reprogrammer le métabolisme cellulaire pour soutenir plus efficacement la prolifération néoplasique. Le second permet aux cellules cancéreuses d'échapper à l'attaque des cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules NK. En outre, l'instabilité génomique et la capacité des tumeurs de promouvoir l'inflammation représentent deux caractéristiques consécutives.

En relation avec ce travail il s'agit surtout de la reconnaissance du microenvironnement tumoral dans le maintien et la progression tumorale, du métabolisme énergétique essentiellement basé sur la glycolyse et surtout de l'évasion immunitaire orchestrée par les cellules tumorales au sein d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Les tumeurs ne doivent donc plus être considérées comme des « masses insulaires » de cellules tumorales mais plutôt comme un tissu complexe composé de multiples types cellulaires distincts mais interagissant les uns avec les autres afin de proliférer et d'envahir le plus possible leur hôte. Les cellules « normales » de l'hôte, recrutées dans la tumeur, doivent ainsi être considérées comme des participants actifs à la tumorigénèse et contribuent activement au développement et à la prolifération tumorale.

Si l'on considère les 6 caractéristiques majeures de la transformation maligne de façon individuelle, on s'aperçoit que le microenvironnement tumoral joue un rôle déterminant

dans quasiment chacune d'entre elles. Par exemple dans les cas de l'autosuffisance en signaux de contrôle où les cellules « normales » du microenvironnement produisent les facteurs de croissance nécessaires à une stimulation mitotique des cellules tumorales et à l'établissement d'un réseau de vaisseaux intra tumoraux nécessaire à la survie et à la prolifération tumorale (Basanta et al., 2009; Fujita et al., 2005; Zhong et al., 2010).

En ce qui concerne l'échappement à la mort cellulaire programmée, il a été montré que le microenvironnement tumoral était capable de protéger les cellules tumorales de l'apoptose, notamment par l'inhibition de la voie Apo2L/TRAIL par le microenvironnement hypoxique (Mace et al., 2006).

En ce qui concerne le métabolisme énergétique, il est clair que le microenvironnement joue ici aussi un rôle déterminant. Contrairement aux cellules normales, les cellules tumorales, qui produisent leur énergie par phosphorylation oxydative mitochondriale, ont tendance à privilégier la glycolyse notamment par la surexpression de transporteurs du glucose comme GLUT1, ce qui augmente significativement l'importation de glucose dans le cytoplasme. (Jones and Thompson, 2009) (DeBerardinis et al., 2008). Cette augmentation de la glycolyse est associée à l'activation de certains oncogènes comme *RAS* et *MYC* ainsi que p53 muté. L'accentuation de la glycolyse est encore plus marquée dans des conditions d'hypoxie qui règnent dans beaucoup de tumeurs (Jones and Thompson, 2009) (DeBerardinis et al., 2008) (Semenza, 2010b), et c'est par l'intermédiaire des facteurs de transcription HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor) que l'hypoxie semble stimuler la glycolyse (Kroemer and Pouyssegur, 2008) (Semenza, 2010a). Il est intéressant de noter qu'au sein d'une même tumeur, certaines sous populations cellulaires ont un métabolisme différent des autres. Elles sont pour certaines

totale­ment dépendantes de la glycolyse et produisent du lactate (effet Warburg) (Warburg, 1956; Warburg et al., 1924), tandis que d'autres préférentiellement importent et utilisent le lactate produit par les premières. En effet, il a été démontré que les clones tumoraux survivant en situation d'hypoxie sévère fonctionnent en sécrétant du lactate comme une sorte de déchet, alors que les autres clones, mieux oxygénés, sont capables de le réutiliser pour leur propre production énergétique (Feron, 2009) (Semenza, 2008).

Une nouvelle caractéristique du cancer considérée comme « émergente » dans la revue de Hanahan et Weinberg est l'échappement tumoral à l'immunosurveillance. En effet, les cellules immunitaires détectent, attaquent et éliminent les envahisseurs extérieurs (microbes, virus...) et assurent ainsi la protection de notre organisme. Elles devraient donc également reconnaître et détruire les cellules cancéreuses. L'idée que le système immunitaire puisse naturellement jouer un rôle dans l'élimination des tumeurs a été formellement émise en 1909 par le scientifique allemand Paul Ehrlich, prix Nobel de médecine 1908. De nature théorique, son raisonnement s'exerce par défaut : si ce mode de contrôle n'existait pas, explique-t-il, on devrait observer un très grand nombre de tumeurs chez les humains. Son article fondateur ouvre un siècle de débats animés qui dessinent progressivement une image de plus en plus complexe des relations entre le système immunitaire et les tumeurs malignes. Ce siècle est ponctué de progrès considérables notamment l'élaboration du concept d'immunosurveillance tumorale qui a été débattu pendant trois décennies avant d'être finalement validé dans les années 1990. Au début des années 2000, les chercheurs prennent conscience que l'immunosurveillance tumorale ne représente en réalité qu'une seule dimension de la relation complexe entre le système immunitaire et le cancer. Différents travaux

aboutissent à l'établissement de l'hypothèse dite de l'immunoediting du cancer, qui permet d'intégrer les diverses fonctions exercées par le système immunitaire tout au long du développement des tumeurs. Brièvement, l'immunoediting du cancer est ainsi un processus dynamique composé de trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. L'élimination représente le concept classique de l'immunosurveillance; l'équilibre correspond à la période de latence après la destruction incomplète de la tumeur dans la phase d'élimination; l'échappement se réfère à la croissance finale des tumeurs ayant réussi à dépasser les contraintes immunologiques de la phase d'équilibre. Ces interactions complexes et naturelles entre système immunitaire et tumeurs ont récemment permis de tirer certaines leçons des échecs passés de l'immunothérapie antitumorale et d'aborder une nouvelle phase de développement de stratégies d'immunothérapie à réel potentiel clinique.

Par ailleurs les pathologistes ont reconnu depuis de nombreuses années que certaines tumeurs sont envahies par de nombreuses cellules immunitaires (Dvorak, 1986). Actuellement avec les méthodes de détection immunohistochimiques il est possible de détecter et de quantifier les différentes cellules immunitaires envahissant les tumeurs (Pages et al., 2010). Initialement cette infiltration était considérée comme une tentative du système immunitaire d'éradiquer la tumeur, et en effet on a pu montrer que l'intensité de l'infiltration immunitaire était de bon pronostic dans de nombreux types de cancer, notamment le colon (Mei et al., 2014) le mélanome (Elder, 2014) et le sein (Melichar et al., 2014) (West et al., 2011).

Cet effet plutôt « bénéfique » attribué à l'infiltration de cellules immunitaires doit être un peu modéré par certaines données qui montrent que la réponse immunitaire

inflammatoire générée par la tumeur peut avoir un effet paradoxal en favorisant la tumorigénèse et la progression tumorale (Grivennikov et al., 2010). L'inflammation peut en effet contribuer au développement tumoral en apportant des molécules bioactives (interleukines, facteurs de croissances, enzymes etc.) dans le microenvironnement tumoral. Ces molécules sont capables d'aider à la dédifférenciation et la prolifération tumorale. Elles contribuent également à l'apparition d'un phénotype mésenchymateux, à induire l'angiogénèse, à l'inhibition de la mort cellulaire et à la modification de la matrice intercellulaire (DeNardo et al., 2010).

Dans les stades les plus précoces de l'oncogénèse on a pu démontrer que l'inflammation pouvait provoquer la transformation de néoplasies indolentes en cancers agressifs (Qian and Pollard, 2010). Par ailleurs, les cellules inflammatoires sont capables de sécréter des toxines telles que les ROS (Reactive Oxygen Species) qui, de part leur capacité oxydative puissante, sont mutagéniques sur les cellules environnantes (Grivennikov et al., 2010).

On peut donc dire en résumé que le microenvironnement inflammatoire engendré par l'infiltration tumorale par des cellules immunitaires peut être considéré comme une arme à double tranchant : les cellules immunitaires sont en effet présentes dans la tumeur, et en cas de besoin peuvent y jouer leur rôle de destruction des cellules tumorales, mais ce microenvironnement inflammatoire peut au contraire aussi agir comme un accélérateur de la transformation maligne et de l'agressivité et de l'invasion tumorale.



### **3. Rôle du microenvironnement dans la progression tumorale**

L'étude du microenvironnement tumoral a pris ces dernières années une place importante dans le domaine de la recherche sur le cancer. En effet, il est désormais bien admis que le caractère invasif d'un cancer primitif est déterminé non seulement par le génotype des cellules tumorales, mais aussi par leurs interactions avec l'environnement extracellulaire qui module les capacités de développement de la tumeur. Il est maintenant de plus en plus clair que le microenvironnement tumoral n'est pas seulement un assemblage passif des cellules immunitaires, mais plutôt un participant actif dans le soutien tumoral et l'établissement de conditions immunosuppressives. L'hypoxie qui règne au sein d'une tumeur est en grande partie responsable de cette immunosuppression dont profite la tumeur. Chaque cellule de ce microenvironnement est en fait capable de s'adapter à ce microenvironnement hostile et de produire des signaux comme des cytokines, des facteurs de croissance, des microvésicules et des microRNA permettant de moduler les cellules immunitaires contenues dans le microenvironnement tumoral.

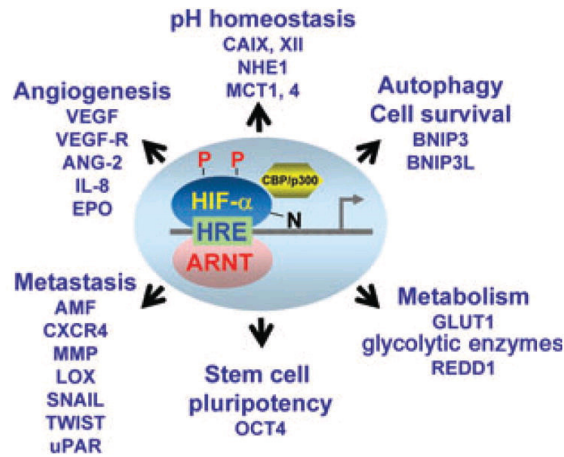
#### **3.1. Le stress hypoxique**

En cancérologie, le phénomène d'hypoxie est reconnu depuis de nombreuses années comme étant une des caractéristiques constantes des tumeurs malignes (Graff et al., 1960) et elle est définie par des conditions de pression partielle en oxygène entre 5 -10 mm Hg (Semenza, 2009). En raison de la croissance rapide des tumeurs, et de la sécrétion non physiologique de facteurs angiogéniques par les tumeurs, la formation homogène de

vaisseaux dans les tumeurs est altérée, ce qui entraîne rapidement l'apparition de zones hypoxiques au sein de ces tumeurs. Les cellules tumorales les plus proches des vaisseaux profitent évidemment d'une plus grande accessibilité aux nutriments et à l'oxygène que celles plus éloignées. Ces zones hypoxiques peuvent, en cas d'hypoxie extrême, entraîner l'apparition de vastes zones nécrotiques au sein de la tumeur, ou en cas d'hypoxie relative entraîner des modifications du métabolisme cellulaire se traduisant par la survie des cellules en autophagie ou la mort de ces cellules par apoptose (Carmeliet and Jain, 2000).

Chaque tumeur est en effet capable de développer un microenvironnement qui se caractérise par des vaisseaux anormaux et un déficit par endroits en oxygène et en nutriments. Cette hypoxie tumorale entraîne un « switch » métabolique vers la glycolyse et un pronostic plus défavorable dans le sens où l'hypoxie tumorale constitue un facteur pronostic et prédictif négatif pour la plupart des cancers. En effet l'hypoxie exerce une sélection des clones tumoraux disposants d'une instabilité génomique accrue, d'une adaptation à l'angiogenèse et d'une capacité d'invasion et métastatique suite à une transition épithélial-Mésenchymateuse (EMT) (Laconi, 2007).

Un des premiers mécanismes intracellulaires décrit en réponse à un stress hypoxique est la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (Semenza, 1998). HIF-1 est un des acteurs essentiels de la réponse cellulaire à l'hypoxie. La stabilisation de ce facteur de transcription peut entraîner la modulation de plus de 60 gènes impliqués dans de nombreux aspects de la biologie cellulaire, comme la survie, le métabolisme du glucose, l'invasion et l'angiogénèse (Semenza, 2010b) (**Figure 3**).



**Figure 3 :** Les différents gènes régulés par HIF (Bedogni and Powell, 2009)

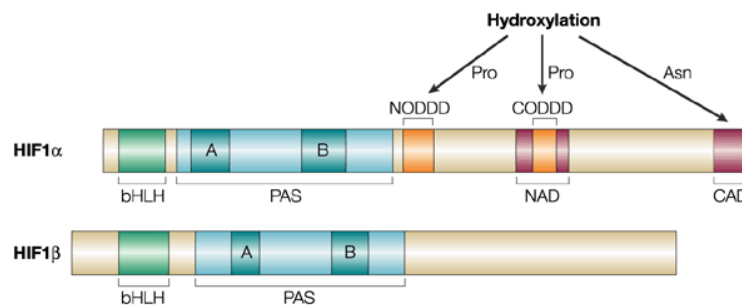
La surexpression de HIF-1 dans la tumeur a été associée à une augmentation de l'agressivité des cellules cancéreuses et une diminution de la survie des patients du cancer du sein, de l'estomac, de l'utérus et des ovaires (Quintero et al., 2004).

### 3.1.1 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)

HIF-1 est un facteur de transcription qui coordonne l'induction de plusieurs gènes, tels que les gènes qui contribuent à compenser le manque d'oxygène. Ces gènes stimulent l'angiogenèse et permettent, en condition d'hypoxie, la vascularisation et donc la prolifération des cellules tumorales. HIF-1 est un hétérodimère constitué de deux sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  (**Figure 4**) (Wang and Semenza, 1995)

HIF-1 $\beta$  a été identifiée comme étant le facteur ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), une protéine déjà décrite et impliquée dans des phénomènes de détoxification des cellules. En revanche, HIF-1 $\alpha$  est spécifique de la réponse hypoxique. Les transcrits des deux sous-unités sont exprimés de façon constitutive dans les cellules (Wiener et al., 1996). Les sous unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  contiennent chacune des domaines bHLH (basic-helix loop helix) et PAS (PER-ARNT-SIM) à leur extrémité N-terminale qui

jouent un rôle dans la dimérisation et la fixation à l'ADN (Wang et al., 1995). HIF-1 $\alpha$  contient d'autres domaines importants pour sa fonction de régulateur de la transcription de gènes cibles par l'hypoxie. Il s'agit de deux domaines de transactivation (TAD) situés dans la partie C-terminale. Ces deux domaines sont séparés par un domaine inhibiteur de la transcription (ID) (Jiang et al., 1997). Il existe aussi un domaine responsable de la dégradation (oxygen-dependent degradation domain ou ODD) de HIF-1 $\alpha$  en normoxie par le protéasome (Huang et al., 1998). Enfin deux séquences de localisation nucléaires ont été décrites dont la première est localisée dans le domaine bHLH et permet la rétention cytoplasmique de la protéine et la seconde séquence localisée dans la partie c-terminale jouerait un rôle clé dans l'import nucléaire dépendant de l'hypoxie de HIF-1 $\alpha$  (Kallio et al., 1998).

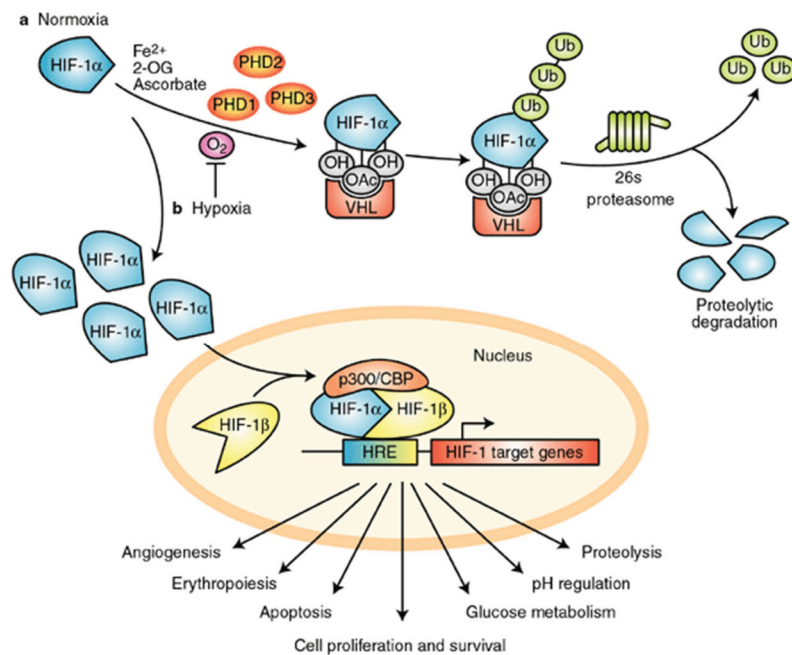


**Figure 4** : Les différents domaines de HIF1 $\alpha$  et HIF1 $\beta$  (Schofield and Ratcliffe, 2004)

### 3.1.2 Régulation de l'activité de HIF-1

Plusieurs études ont permis de révéler le mécanisme de régulation de l'activité de HIF-1 en normoxie et en hypoxie. En normoxie, la protéine HIF-1 $\alpha$  est très instable. La HIF-1-prolyl hydrolase hydroxyle les prolines P402 et P534 situées dans le domaine ODD de HIF-1 $\alpha$ . Ensuite, le complexe pVHL (von Hippel-Lindau) qui présente une activité E3 ubiquitine ligase se fixe à HIF-1 $\alpha$  hydroxylée conduisant ainsi à l'ubiquitinylation et à la dégradation

de HIF-1 $\alpha$  par le protéasome. La lysine K532 semble jouer un rôle important dans la dégradation de HIF-1 $\alpha$ . En hypoxie, HIF-1 $\alpha$  n'est plus hydroxylé et ne fixe plus pVHL. Il y a translocation nucléaire de HIF-1 $\alpha$ . Celle-ci se fixe alors à son partenaire HIF-1 $\beta$ , qui est relativement stable et exclusivement nucléaire pour former le facteur de transcription HIF-1. HIF-1 se fixe alors sur la séquence HRE des gènes sensibles à l'hypoxie et induit la transactivation de ces derniers (**Figure 5**). L'hypoxie joue donc à plusieurs niveaux sur la sous-unité HIF-1 $\alpha$ : en la stabilisant, en favorisant sa translocation nucléaire et, enfin, en augmentant l'activité transactivatrice. Plusieurs co-facteurs peuvent intervenir en se fixant au complexe HIF-1 pour augmenter sa transactivation. Il a été ainsi montré que la protéine chaperon Hsp90 était capable de se fixer à HIF-1 $\alpha$  et d'activer la transactivation d'HIF-1.



**Figure 5 : Mécanisme de régulation de HIF**  
*(Expert Reviews in Molecular Medicine Vol. 7; Issue 6; 15 April 2005)*

### **3.1.3 Les différents mécanismes activés par l'hypoxie dans les cellules tumorales**

L'hypoxie dans le microenvironnement tumoral est un facteur de mauvais pronostic bien établi depuis de nombreuses années. L'hypoxie est impliquée dans la résistance tumorale aussi bien aux agents chimiothérapeutiques que à la radiothérapie, et de nombreux efforts pharmacologiques ont été entrepris pour contrecarrer cette résistance (Carmeliet and Jain, 2000; Rockwell, 1992). Plus récemment il a été reconnu que l'hypoxie jouait un rôle également important dans l'évasion tumorale aux systèmes immunitaires inné et adaptatif (Baginska et al., 2013; Hasmim et al., 2014; Noman et al., 2011). Les mécanismes sous-jacents à ces résistances sont partiellement élucidés et sont quasi tous, à des degrés divers, dépendants de HIF. Une des classes de gènes sous le contrôle de HIF-1 $\alpha$  sont les gènes liés à l'angiogénèse, tels que le VEGF, VEGF-R, ANG-2... etc. (Keith and Simon, 2007). Ces gènes peuvent être directement régulés par HIF en situation d'hypoxie, ou bien par l'intermédiaire d'un miRNA (Madanecki et al., 2013) qui joue le rôle de régulateur post-transcriptionnel.

Ci-après, nous allons brièvement citer l'effet de l'hypoxie sur certains processus cellulaires impliqués dans les différents aspects de l'agressivité des cellules tumorales. Par ailleurs, nous allons détailler le rôle de l'hypoxie dans l'activation du processus d'autophagie, que nous avons étudié au cours de cette thèse.

#### **3.1.3.1 Hypoxie et la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT)**

L'hypoxie a également la capacité d'influencer les mécanismes intrinsèques qui régissent l'EMT (Jiang et al., 2011). Ainsi, sous stress hypoxique, le TGF $\beta$  est capable de recruter et

de phosphoryler ses médiateurs cytoplasmiques, les SMADs, qui peuvent alors interagir avec les facteurs de transcription de l'EMT tels que Snail, Slug et SIP pour induire le processus d'EMT (Zavadil and Bottinger, 2005). Le TGF $\beta$  peut aussi déclencher l'EMT de part sa coopération avec différentes autres voies telles que Ras, Wnt/ $\beta$  catenin et NF- $\kappa$ B (Cummins et al., 2006; Neth et al., 2007). TGF $\beta$  co-régule en plus la voie des cyclooxygénases avec HIF-1 et contribue ainsi à l'activation de l'EMT (Lee et al., 2010b). Il est donc évident que l'hypoxie joue un rôle fondamental dans l'initiation de l'EMT ainsi que dans la croissance cellulaire, l'invasion et les métastases de part l'implication de ces différentes voies.

### **3.1.3.2 Le stress hypoxique et le métabolisme glucidique**

Comme déjà évoqué plus haut, l'hypoxie entraîne une réorientation, ou « Switch » métabolique vers la glycolyse (Laconi, 2007) qui en fonction de la profondeur de l'hypoxie peut ou bien aboutir à la production de lactate par l'effet Warburg, ou bien à un état capable de réutiliser le lactate produit par ses voisines plus hypoxiques afin de produire son énergie (Feron, 2009).

### **3.1.3.3 Hypoxie et cellules souches**

La croissance tumorale est fortement dépendante de la présence d'une sous-population tumorale pluripotente, aussi appelée cellule souche tumorale. Ces cellules qui se trouvent dans un état indifférencié (Reya et al., 2001) sont capables de recréer une tumeur après implantation dans des souris immunodéficientes (Pardal et al., 2003).

L'hypoxie ainsi que les HIFs ont été décrits comme ayant la capacité d'induire une différenciation des cellules tumorales et de les maintenir dans un phénotype ressemblant à des cellules souches par l'expression de gènes comme OCT4, SOX2 et NANOG ou par l'activation de la voie Notch (Chen et al., 2007; Keith and Simon, 2007).

#### **3.1.3.4 Hypoxie et Micro-RNAs**

Outre les mécanismes transcriptionnels classiques, l'hypoxie est également capable d'influencer le métabolisme de la cellule tumorale par le biais d'un contrôle post-transcriptionnel par les micro-RNAs. Ceci sera réexaminé plus en détail dans la section des résultats de cette thèse, mais retenons dorénavant et déjà que les miRNAs régulés par l'hypoxie (HRMs) sont capables de contrôler les processus importants dans la cancérogénèse tels que l'angiogénèse et la survie et la mort cellulaire (Kulshreshtha et al., 2008; Kulshreshtha et al., 2007). Il a aussi été montré que certains HRMs sont capables de moduler l'expression de HIF-1 $\alpha$  (Loscalzo, 2010).

Le HRM le plus décrit à ce jour est le miR-210, il est surexprimé en réaction à l'hypoxie, aussi bien dans des cellules normales que transformées. MiR-210 est généralement considéré comme une cible robuste de HIF et un marqueur de tissus exposés à l'hypoxie (Devlin et al., 2011; Huang et al., 2009).

Par ailleurs, la surexpression de miR-210 peut prolonger la survie de cellules mésenchymateuses dans un modèle murin, par la répression de l'expression de la caspase-8-associated protein 2 (CASP8-AP2) qui est un régulateur proapoptique de l'apoptose médiée par Fas (Kim et al., 2009), et de réguler d'autres gènes impliqués dans l'angiogénèse, la cancérogénèse et la survie cellulaire (Devlin et al., 2011).

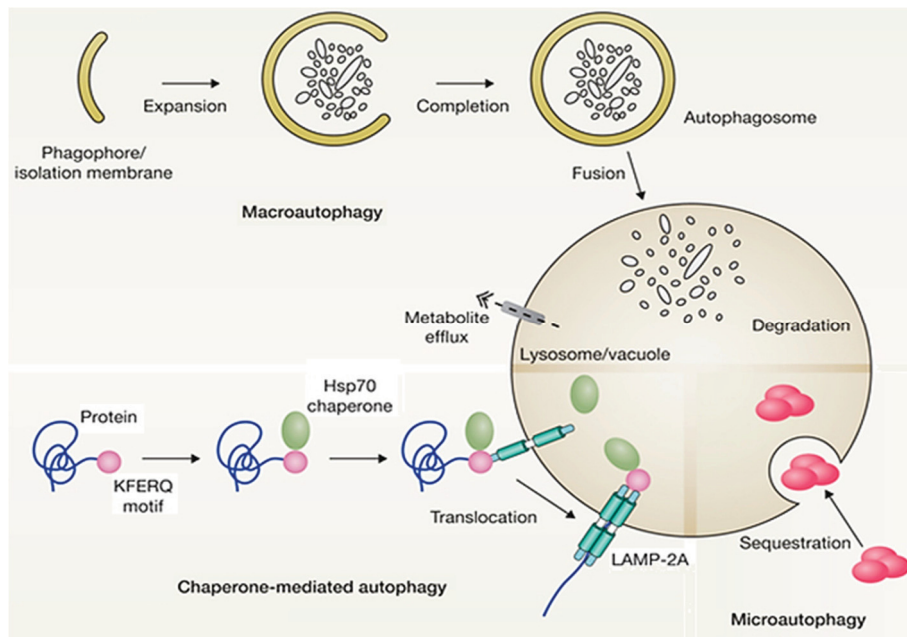


### **3.2. L'autophagie**

L'autophagie a été initialement décrite par Christian de Duve lors du « Ciba Foundation Symposium on Lysosomes » à Londres en 1963 (De Duve et al., 1963; Klionsky, 2008). A l'époque le Professeur de Duve travaillait sur le glucagon qui est un inducteur puissant de l'action « autophagique » des lysosomes dans les hépatocytes (de Duve et al., 1955; de Duve and Wattiaux, 1966). Dans cette situation une injection unique d'une dose importante de glucagon provoque un recrutement massif de lysosomes formant ainsi des vacuoles « autophagosomes » permettant la digestion de divers organelles y compris les mitochondries. Ces observations faites par des techniques de microscopie électronique (Ashford and Porter, 1962) ont ainsi permis de visualiser la production de grandes quantités de glucose par gluconéogenèse hépatique, effet physiologique bien connu du glucagon. Les mécanismes exacts de ces transferts et l'implication dans l'autophagie ont encore été étudiés plus tard (Lockshin and Williams, 1965; Schweichel and Merker, 1973) et sont finalement élucidés avec précision de nos jours, en utilisant les outils modernes de recherche en autophagie comme les modèles de souris déficients en ATG5 (Ezaki et al., 2011).

D'un point de vue morphologique, il s'agit d'un mécanisme extrêmement bien conservé au cours de l'évolution impliquant la formation de vésicules à double membrane appelés autophagosomes, ces autophagosomes séquestrent des organelles et autres contenus cytoplasmiques puis fusionnent avec des lysosomes pour être dégradés à des fins de production énergétique (Yang and Klionsky, 2010).

Dans notre contexte, quand nous parlons d'autophagie, il s'agit normalement de ce qui est aussi appelé macroautophagie. D'autres formes d'autophagie comme la microautophagie ou l'autophagie médiée par les chaperones seront présentées brièvement (**Figure 6**).



*Figure 6 : Les différentes formes d'autophagie (Boya, 2005)*

### 3.2.1 Mécanisme moléculaire de l'autophagie

La macroautophagie est une voie de dégradation servant essentiellement à éliminer les organelles et les protéines endommagées ou inutiles. Comme déjà décrit ci-dessus, la première étape de l'autophagie est la formation d'une double membrane issue du réticulum endoplasmique qui va former le futur autophagosome (Mizushima et al., 2002) (Cesen et al., 2012). La formation des autophagosomes est sous le contrôle des gènes ATG (autophagy related genes), initialement découverts chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Levine and Klionsky, 2004).

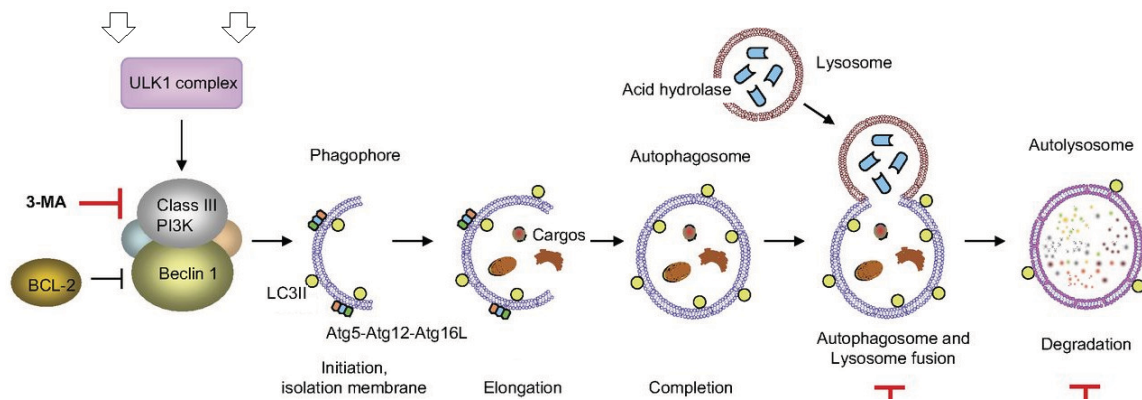
La phosphatidyl inositol 3-phosphate kinase (PI3K) de classe III associée à la protéine Bécline 1 et deux systèmes de conjugaison qui fonctionnent à l'instar de l'ubiquitinylation et de la sumoylation des protéines est impliqué dans la formation des autophagosomes

La formation des autophagosomes nécessite des étapes initiales qui consistent dans la production de phosphatidyl inositol 3-phosphate par le complexe PI3K classe III-Bécline 1, entraînant ainsi le recrutement du premier système de conjugaison (Atg12-Atg5). Le complexe Atg12-Atg5 permet, par la suite, la conjugaison de la phosphatidyl éthanolamine (PE) à l'extrémité C-terminale de la protéine LC3 qui s'associe alors à la membrane autophagosomale. A l'exception de cette dernière protéine une quinzaine de protéines Atg impliquées dans la formation de l'autophagosome vont se dissocier rapidement de la membrane de l'autophagosome.

Outre leur rôle dans l'induction de l'autophagie, certaines protéines Atg, telles que Atg5 et Bécline1, peuvent avoir d'autres fonctions dans la cellule. Ainsi, Il a été démontré que le clivage de la protéine Atg5 par la calpaïne génère un peptide présentant des propriétés pro-apoptotiques (Yousefi et al., 2006). De même, la bécline1 contient un domaine BH3, similaire aux domaines BH3 des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl2, ce qui lui confère un rôle pro-apoptotique (Maiuri et al., 2007). Alors qu'il a été montré que la fixation des protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-XL au domaine BH3 de Bécline 1 inhibe le rôle essentiel de cette dernière dans l'induction de l'autophagie, les conséquences de cette interaction sur la régulation des réponses apoptotiques ne sont que très peu étudiées. L'ensemble de ces études démontre clairement que les protéines impliquées dans l'autophagie interagissent directement avec la voie de signalisation de

l'apoptose. Cependant, les preuves expérimentales montrant le rôle de ces protéines dans la mort apoptotique in vivo font défaut.

La microautophagie implique au contraire la capture directe de matériel cytoplasmique dans l'autophagolysosome par invagination de sa membrane (Boya, 2005) (Cesen et al., 2012). L'autophagie médiée par les chaperones est un phénomène très complexe et spécifique qui implique la liaison de la protéine à éliminer par un complexe contenant la heatshock protein 70 (hsc70) (Bandyopadhyay et al., 2008; Cesen et al., 2012). La protéine doit donc contenir un motif reconnaissable par le chaperon hsc70 p.ex. KFERQ. Après reconnaissance par une protéine transmembranaire comme de type LAMP-2A, a protéine substrat est dépliée, traverse la membrane et est dégradée (Boya, 2005) (Imielinski et al., 2012) (**Figure 7**).



**Figure 7** : Le mécanisme moléculaire de l'autophagie (Ohsumi, 2001)

### 3.2.2 Le rôle anti- et pro-tumoral de l'autophagie

Dans la cellule tumorale, l'autophagie peut jouer un rôle aussi bien anti-tumoral que pro-tumoral en fonction de la situation du type de tumeur, du grade et des différents stress auxquels les cellules sont exposées, comme le manque de nutriments, de facteurs de croissance ou l'hypoxie (Mathew, 2007).

Ainsi l'autophagie joue un rôle anti-tumoral de l'autophagie par son implication dans la prévention des dommages induits à l'ADN. Dans ce contexte, il a été démontré que, dans les conditions de stress métabolique, l'inhibition de l'autophagie par l'inactivation des gènes *bécline1* et *atg5* augmente les dommages à l'ADN ainsi que l'instabilité chromosomique des cellules, ce qui se traduit par une amplification génique et une accélération de la progression tumorale. Ces résultats suggèrent que l'autophagie joue un rôle important dans l'instabilité chromosomique par sa capacité d'éliminer des composantes génotoxiques de la cellule tels que les ERO, les organelles endommagées, les protéines et les lipides oxydés (Mathew, 2007)

L'autophagie peut également jouer un rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. En effet, il a été montré que l'inactivation mono-allélique du gène *Bécline 1* chez la souris augmente la prolifération des tissus sujets à former des tumeurs, alors que la réexpression de ce gène dans des cellules tumorales ralentit leur prolifération (Levine and Klionsky, 2004). De même, l'inactivation du gène *Atg5* chez la souris entraîne une augmentation de prolifération des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> stimulés par leurs récepteurs. Bien que ces études montrent un lien entre l'autophagie et la prolifération cellulaire, les événements moléculaires impliqués dans cette régulation ne sont pas complètement connus (Pua et al., 2007).

D'autres études ont démontré que l'autophagie induite par un stress métabolique protège les cellules possédant un défaut d'apoptose, de la mort nécrotique et de l'inflammation qui en résulte. Etant donné que l'inflammation chronique dans les tumeurs entraîne le relargage de cytokines et favorise l'angiogenèse, l'autophagie, en inhibant la nécrose, pourrait empêcher l'inflammation et la progression tumorale (Mathew et al., 2007).

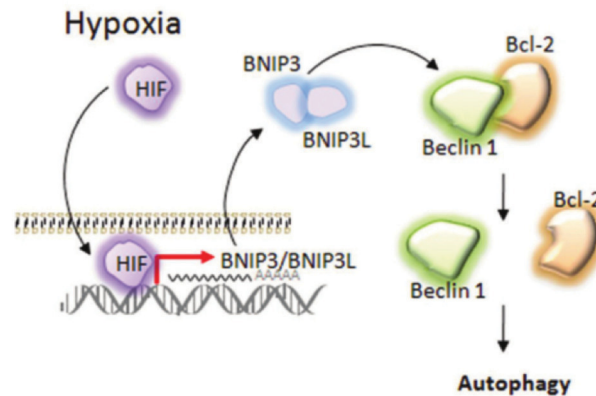
Bien que les études précédentes plaident en faveur du rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie, d'autres études montrent que l'autophagie est une composante de la progression tumorale. C'est notamment le cas lorsque les cellules tumorales sont exposées à des situations de stress métabolique du fait de leur faible vascularisation qui limite l'apport en nutriments et en oxygène (Ogier-Denis and Codogno, 2003). Dans ce contexte, il a été démontré que l'autophagie agit comme un mécanisme de survie des cellules tumorales dans un environnement hypoxique, en permettant le maintien du métabolisme et de l'énergie nécessaire à leur survie (Mathew et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats montre que l'autophagie joue donc un double rôle au cours de la progression tumorale. Dans les phases précoces de la tumorigenèse, l'autophagie permet de restreindre la progression tumorale en limitant la prolifération cellulaire et les dommages à l'ADN. Lorsque la tumeur se développe et que sa vascularisation est encore restreinte, l'autophagie peut favoriser la survie des cellules tumorales situées dans des régions hypoxiques des tumeurs. Le rôle pro-tumoral de l'autophagie a été également décrit dans les cellules métastatiques subissant différents stress environnementaux tels que la perte d'interaction avec la matrice extracellulaire et l'absence de facteurs de croissance au cours de leur migration. De façon paradoxale, et à plus long terme,

l'autophagie en tant que mécanisme de survie, induit en réponse aux stress métabolique ou hypoxique dans les tumeurs solides, pourrait être un mécanisme suppresseur de tumeur, notamment quand les tumeurs présentent un défaut d'apoptose. En effet, l'inhibition de l'autophagie dans ces conditions entraîne la nécrose des cellules. Mais ce processus engendre des réponses inflammatoires, ce qui contribue à l'angiogenèse et à l'accélération de la progression tumorale. Ainsi, l'inhibition concomitante de l'autophagie et de l'apoptose dans les tumeurs conduit aussi à une augmentation de l'instabilité chromosomique des cellules. Ceci se traduit par une amplification des gènes favorisant la progression tumorale et par la suite peut conduire à l'échappement des tumeurs aux traitements anticancéreux. Dans les tumeurs présentant une délétion mono-allélique du gène *BECN1*, la stimulation de l'autophagie par des approches pharmacologiques pourrait être considéré comme une stratégie de chimio-prévention de ces tumeurs puisqu'elle limite l'accumulation des dommages à l'ADN et des mutations qui en résulte.

### **3.2.3 Le mécanisme de l'activation de l'autophagie par le stress hypoxique**

Dans la cellule cancéreuse en hypoxie, l'activation du mécanisme d'autophagie dépend de HIF-1 $\alpha$  qui active la transcription des protéines BH3-only, *BNIP3* et *BNIP3L*, qui vont alors déplacer Beclin1 de son interaction avec Bcl-2 qui protégeait la cellule de l'induction de l'autophagie (Bellot et al., 2009; Mazure and Pouyssegur, 2010) (**Figure 8**).



**Figure 8** : Mécanisme moléculaire de l'induction d'autophagie par le stress hypoxique (Noman et al., 2011)

Par ailleurs l'hypoxie augmente la transcription de deux gènes essentiels d'autophagie le *LC3* et *ATG5* par l'activation des facteurs de transcriptions ATF4 et CHOP (Rouschop et al., 2010). L'autophagie a également été mise en rapport avec des mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux (Livesey et al., 2009). Dans certaines lignées tumorales, l'hypoxie augmente la transcription de LC3, qui est essentielle au maintien d'une autophagie tumorale. Un réapprovisionnement constant de cette protéine est donc nécessaire pour maintenir une autophagie et une survie cellulaire au cours de l'hypoxie (Rouschop et al., 2010).

En résumé, on peut donc considérer l'autophagie comme un acteur essentiel du microenvironnement hypoxique, aidant par ce biais la cellule tumorale à survivre. Un autre rôle de l'autophagie dans le microenvironnement tumoral est celui de moduler l'immunité aussi bien adaptative que innée (Levine et al., 2011), mais ceci sera traité ailleurs dans cette thèse.

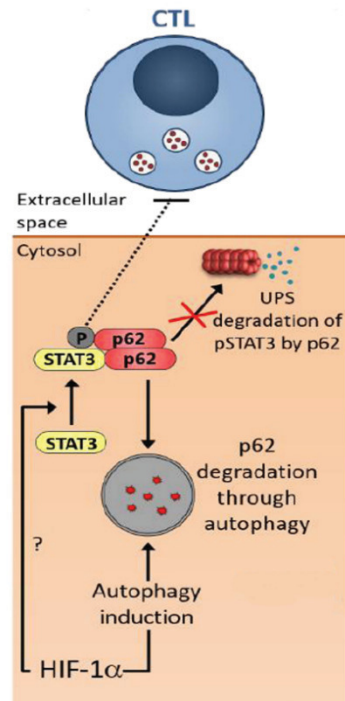


### **3.3. Le stress hypoxique et la réponse immunitaire anti-tumorale**

Il a été démontré que le stress hypoxique est accompagnée par une diminution de la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les cellules T cytotoxiques (Noman et al., 2009; Noman et al., 2011). En effet l'hypoxie mène à une induction et une stabilisation de HIF-1 $\alpha$  et une phosphorylation de STAT3 ainsi qu'une translocation nucléaire des deux. Le stress hypoxique provoque également une augmentation de l'expression du marqueur embryonnaire NANOG (Hasmim et al., 2011) et induit l'autophagie (Noman et al., 2012). En effet NANOG, un facteur de transcription exprimé dans les cellules souches embryonnaires et responsable du renouvellement cellulaire, est surexprimé et induit la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT 3. Ce qui avait précédemment été montré diminuer la sensibilité des cellules tumorales à la lyse par les CTLs (Noman et al., 2009).

En général, l'hypoxie est capable d'induire une perte de la différenciation dans divers types cellulaires en augmentant l'expression de facteurs de transcription de NANOG, mais également de SOX2 et du ligand de Notch (Axelson et al., 2005; Heddleston et al., 2009). Notre groupe a montré par la suite que l'induction d'une résistance aux CTLs des cellules tumorales pulmonaires ainsi que la phosphorylation de STAT3 en conditions d'hypoxie était lié à l'autophagie tumorale induite par l'hypoxie (Noman et al., 2011). Le mécanisme de cette accumulation de p-STAT3 passe par la protéine cargo p62 qui est capable de provoquer la dégradation protéosomale de p-STAT3. En effet dans des cellules autophagie compétentes, le p62 est constamment utilisé par cette voie et n'est pas disponible pour dégrader p-STAT3, donc ce dernier peut inhiber les CTLs. En situation de

bloquage de la casaque autophagique, p62 est par contre disponible pour dégrader pSTAT3 et donc pas d'inhibition des CTLs. **(Figure 9)**



**Figure 9** : Rôle de l'hypoxie dans l'induction de phospho-STAT3 et la régulation de la lyse spécifique par les CTLs

Notre groupe a montré plus récemment que en conditions d'hypoxie, HIF régulate également directement PD-L1, un des ligands de la voie des « checkpoint » immunologiques qui constitue un des mécanismes essentiels de l'induction d'une tolérance immunologique envers le soi. Ce phénomène est ainsi détourné par la cellule tumorale qui exprime également ce ligand et qui par cela contribue à engendrer le microenvironnement immunosuppresseur dont elle a besoin pour survivre. PD-L1 le ligand de PD1 est exprimé donc entre autres sur les cellules tumorales, les lymphocytes T mais aussi les macrophages, les MDSCs et les cellules dendritiques, (Noman et al., 2014). Ce ligand est actuellement une cible thérapeutique très prometteuse dans de nombreux

cancers tels que le mélanome, le cancer du rein et le cancer du poumon. Il est montré également que l'hypoxie induit une surexpression HIF-1 $\alpha$  dépendante, non seulement sur les cellules tumorales mais également sur les autres cellules du microenvironnement tels les lymphocytes T, les macrophages, les MDSCs et les cellules dendritiques. Le blocage pharmacologique de PD-L1 par un anticorps en conditions d'hypoxie s'accompagne d'une diminution de la sécrétion de l'IL-6 et de IL-10 par les MDSCs et d'une réactivation des cellules T cytotoxiques.

### **3.3.1 Le rôle du microenvironnement tumoral dans la régulation des cellules immunitaires infiltrant la tumeur.**

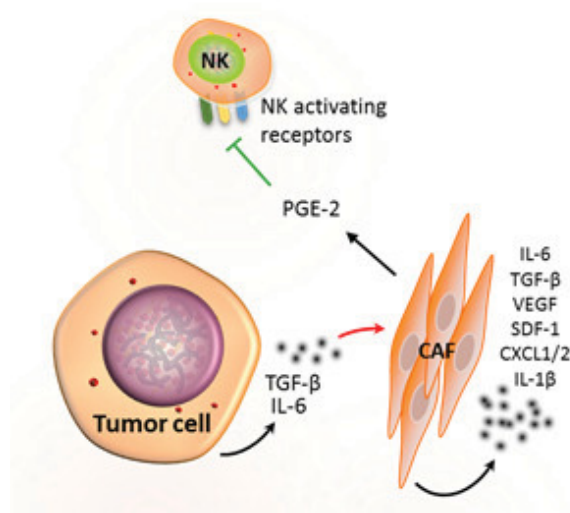
Le stroma tumoral a longtemps été considéré comme ayant un rôle trophique et de soutien uniquement. Ce n'est que depuis qu'on a pu montrer que des cellules mésenchymateuses étaient « reprogrammées » en cellules stromales, qu'elles avaient des caractéristiques génétiques similaires à la cellule tumorale et qu'elles communiquaient avec les cellules tumorales par la sécrétion de facteurs de croissance, de microRNAs etc. que le stroma tumoral a été reconnu à sa juste valeur (Cheng et al., 2012; Mitra et al., 2012; Rappa et al., 2012).

Les interactions entre le microenvironnement tumoral et les cellules du système immunitaire sont en partie responsable de l'immunoévasion que l'on observe dans la plupart des tumeurs. Un des facteurs importants favorisant cette immunoévasion est le fait que la tumeur au cours de son développement peut créer un microenvironnement hypoxique favorisant d'avantage son développement et affectant les différentes cellules

infiltrant la tumeur. Dans la partie suivante nous allons décrire les différentes cellules infiltrant la tumeur et discuter l'effet de microenvironnement tumoral sur leur fonction.

### **3.3.2 Les cellules stromales d'origine fibroblastique**

Les fibroblastes intra-tumoraux ou CAF (cancer associated fibroblasts) sont des cellules de soutien par excellence et qui ont été mis en cause comme acteurs importants du stroma tumoral. En effet, ils peuvent être impliqués dans la création d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Ces fibroblastes peuvent être activés par des cytokines comme le TGF  $\beta$  et l'IL-6 secrétés par la tumeur et peuvent par la suite très fortement interférer avec la cytotoxicité des NKs. En effet les CAF sont capables d'inhiber la surexpression des récepteurs activateurs des NK comme NKp44, NKp30 et DNAX provoquée par l'IL-2, et contribuent ainsi à la création d'un microenvironnement immunosuppresseur (Balsamo et al., 2009; Giannoni et al., 2010). L'expression de NKp44 et de NKp30 est directement modulée par le prostaglandine E2 (PGE2) secrétée par les CAFs. Cette inhibition résulte en une incapacité des cellules NK de lyser des cellules de mélanome (Balsamo et al., 2009). Les CAFs sont également capables d'impacter directement le microenvironnement tumoral par la sécrétion de facteurs comme IL-6, TGF- $\beta$ , VEGF, SDF-1, CXCL1/2 et IL-1 $\beta$  (Pietras and Ostman, 2010). **(Figure 10)**



**Figure 10 :** Rôle des CAF dans la régulation des cellules NK

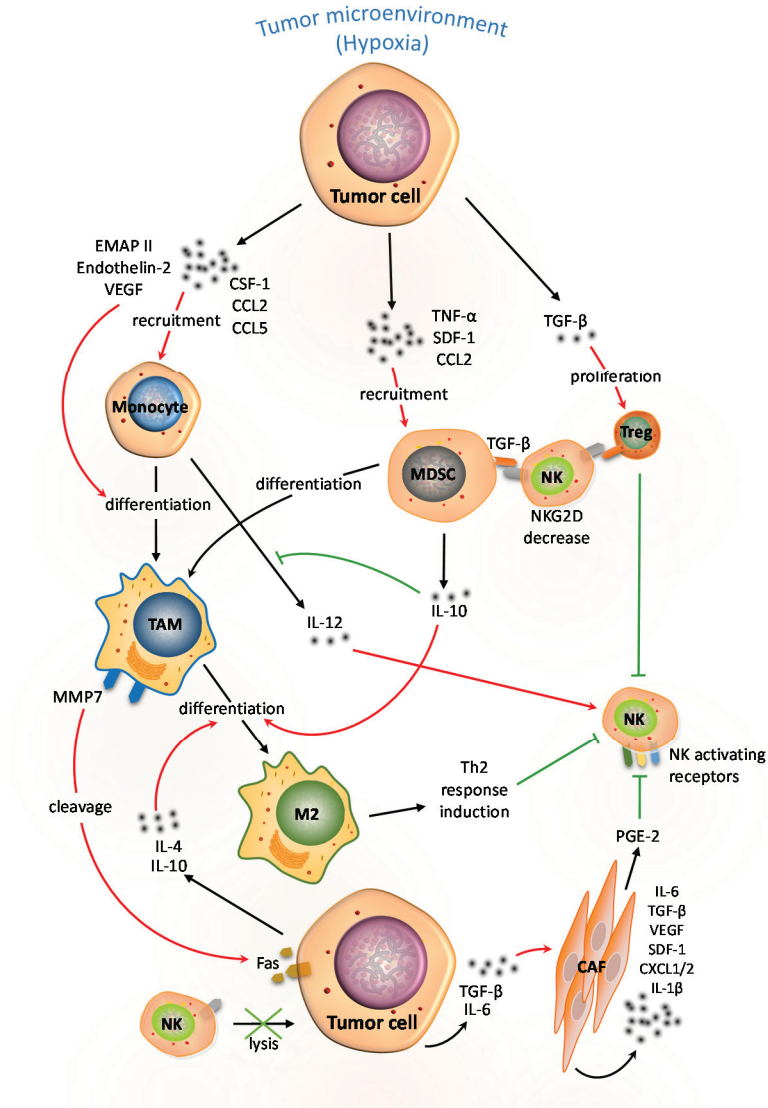
### 3.3.3 Les cellules stromales d'origine myéloïde

Il a été montré que les tumeurs hypoxiques, de part leur capacité à sécréter des cytokines comme le TNF- $\alpha$  ou le SDF-1, attirent dans le microenvironnement tumoral des cellules souches myéloïdes CD45+ (myeloid derived suppressor cells ou MDSC), ces cellules ont la capacité d'induire un environnement hautement immunosuppresseur autour d'eux, ce qui évidemment profite à la tumeur (Mantovani et al., 2008; Murdoch et al., 2004). La fonction immunosuppressive des MDSC est liée à leur sécrétion d'IL-10 qui diminue la production d'IL-12 par les macrophages, IL-12 qui est bien connue pour activer les cellules NK (Sinha et al., 2007). Il a également pu être montré que des MDSC isolés à partir de tumeurs et cultivés in vitro pouvaient induire une anergie des cellules NK en inhibant leur cytotoxicité, leur expression de NKG2D ainsi que leur production d'IFN-gamma (Li et al., 2009) (**Figure 11**).

Par ailleurs, il a été montré que l'hypoxie était responsable de la différenciation des MDSC en macrophages associés à la tumeur (tumor associated macrophages TAM) (jusqu'à 80%

dans certaines tumeurs du sein (Allavena et al., 2008) qui constituent un facteur de mauvais pronostic chez des patients avec des tumeurs évoluées (Bingle et al., 2002; Corzo et al., 2010; Sica et al., 2008).

Les TAM, qui ont tendance à s'accumuler dans les zones hypoxiques des tumeurs, se transforment sous l'influence des cytokines comme l'IL-4, et l'IL-10 secrétés par la tumeur, en macrophages de type M2 qui détourne les lymphocytes T helper et suppressors vers un environnement pro-tumoral immunosuppresseur ou encore appelé de type 2 (Webb et al., 2007). Il a par ailleurs été montré que l'hypoxie provoque l'upregulation des métalloprotéinases matricielles de type 7 (MMP-7) à la surface de ces TAMs entraînant le clivage de FAS ligand sur les cellules tumorales avoisinantes ce qui inhibe évidemment l'immunité NK ainsi que la cytotoxicité liée aux lymphocytes T (Burke et al., 2003).



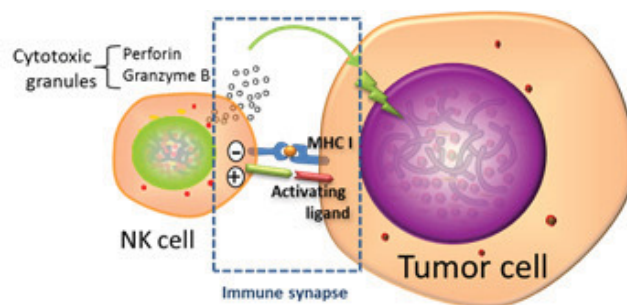
**Figure 11** : les interactions cellulaires dans le microenvironnement tumoral

### 3.3.4 Les cellules Natural killer (NK)

Les NK représentent la troisième sous population de lymphocytes chez les mammifères. Ils se présentent comme des grands lymphocytes granulaires dans le sang périphérique qui portent à leur surface une multitude de récepteurs pouvant transmettre des signaux de stimulation ou d'inhibition (Huntington et al., 2007). Leur morphologie peut varier néanmoins quand ces cellules se trouvent dans d'autres organes comme le poumon ou la rate (Timonen et al., 1981). Chez l'homme on observe environ 20 à 500 cellules par

microlitre de sang, ce qui représente environ 15% des lymphocytes circulants ayant un rôle critique dans l'immunité innée (Biassoni, 2008). Contrairement aux cellules B et T, les NK ne requièrent pas de sensibilisation par des antigènes afin de développer leur potentiel cytotoxique (Orange and Ballas, 2006). Leurs fonctions essentielles peuvent se résumer en 3 points : Cytotoxicité, Immunomodulation par sécrétion de cytokines, et immunomodulation par l'intermédiaire de molécules de costimulation exprimées à leur surface (Zimmer, 2010).

La cytotoxicité NK implique deux molécules secrétées, la perforine capable de perméabiliser la membrane cellulaire et le Granzyme capable d'activer un mécanisme de mort cellulaire programmé. En effet il a été montré que la cytotoxicité par sécrétion de granules nécessite une interaction directe entre la cellule effectrice et la cellule cible. Cette interaction est aussi appelée synapse immunologique. Les granules secrétés par la cellule effectrice contiennent des molécules pouvant activer la cascade apoptotique selon le mode caspase indépendant (Granzyme A) et caspase dépendent (Granzyme B) (Young et al., 1986). Ces granules sont alors internalisés dans la cellule cible et elles libèrent leur contenu grâce à l'action de la perforine. (Browne et al., 1999; Froelich et al., 1996).  
**(Figure 12).**

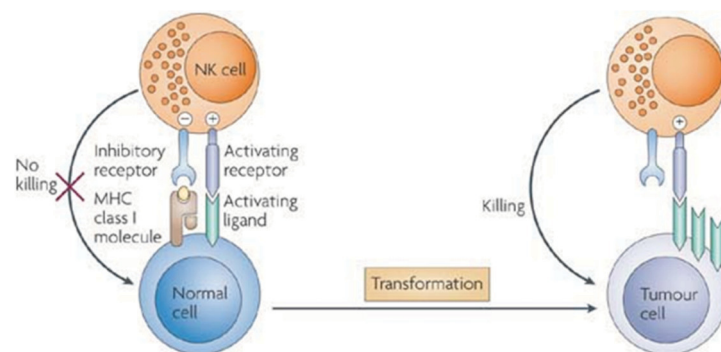


**Figure 12** : mécanisme d'interaction entre les cellules tumorales et les NK



Un autre mécanisme de transfert du contenu des granules cytotoxiques dans le cytoplasme de la cellule cible, sans la nécessité de perforer la membrane, a été proposé plus tard. Ainsi, le contenu serait transporté activement dans le cytoplasme à l'aide du protéoglycan serglycine, avec lequel la granzyme forme un complexe (Metkar et al., 2002).

La régulation de la fonction cytotoxique des cellules NK se fait par des récepteurs activateurs et inhibiteurs qui à leur tour vont activer ou non des cascades intracellulaires qui aboutiront à l'activation de la machinerie capable de cytotoxicité. C'est la balance entre ces deux signaux qui détermine le devenir d'une cellule cible. Les cellules normales sont néanmoins protégées contre l'action cytotoxique des NK en raison de l'expression à leur surface de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité HLA de classe I. Si néanmoins une cellule du soi perd cette expression suite à la transformation ou l'infection, la cellule n'est plus protégée contre l'action cytotoxique des cellules NK et peut être détruite, il s'agit du mécanisme de l'absence de reconnaissance du soi. A fortiori, la transformation ou l'infection peut aussi induire la production de ligands de stimulation capables de supplanter l'action des signaux inhibiteurs ce qui équivaut à une reconnaissance du soi induite. En cas de transformation ou infection on est donc en présence de plusieurs mécanismes capables de reconnaître la situation et de favoriser une destruction par les cellules NK (Raulet and Vance, 2006) **(Figure 13)**.



**Figure 13** : *Mechanism de reconnaissance des cellules normales ou tumorales par les NK. (Vivier et al., 2012)*

La cytotoxicité envers des cellules infectées par un virus est le rôle certainement le mieux connu des cellules NK. Ceci a été bien montré par des expériences dans lesquelles des cellules NK ont été isolées chez des sujets en cours d'une infection virale et qu'il a été clairement montré que ces cellules NK avaient un potentiel cytotoxique nettement plus important in vitro. Cette activation des cellules NK par l'infection virale et la sécrétion d'IFN et de IL-15 entraîne la prolifération des cellules NK et le recrutement dans les organes infectés (Lodoen and Lanier, 2005). Le mécanisme d'activation des cellules NK en présence de cellules infectées par un virus semble impliquer la présentation par le CMH-E de différents peptides d'origine virale. La cellule NK peut, en fonction du récepteur NKG2A ou NKG2C (le premier inhibiteur et le second activateur) auquel l'antigène est présenté, décider si le processus d'activation et de cytotoxicité est bien mis en route. Il s'agit donc comme souvent en biologie, d'un équilibre entre les stimuli activateurs et inactivateurs qui, s'il penche vers l'un ou l'autre côté, décide de la mise en route de la machinerie de destruction de la cellule infectée (Guma et al., 2006; Kaiser et al., 2005).

Une autre classe de protéines membranaires est également impliquée dans ce mécanisme de stimulation ou de répression, les MICA/B. Il s'agit de protéines proches du CMH de classe I (MHC Class I chain-related ou MIC) qui existent dans un grand nombre de variantes, ses gènes codent pour 61 allèles pour MICA et 30 allèles pour MICB, ce qui correspond probablement à une tentative du système immunitaire de contrecarrer l'immunoévasion virale (Chalupny et al., 2006).

S'il est clair que des cellules NK au repos circulent dans le sang périphérique, elles sont néanmoins capables d'infiltrer la plupart des tissus cancéreux à la suite d'une activation par des cytokines comme l'IL12, l'IL15, l'IL2 ou l'IFN $\alpha$  (Smyth et al., 2002). Au sein de la tumeur, ces cellules peuvent, tout comme dans l'infection virale, être soit activées ou inhibées par la rencontre de leurs récepteurs avec des ligands activateurs, spécifiques de la tumeur ou de l'environnement inflammatoire tumoral, ou avec des inhibiteurs, provenant également de la tumeur ou de cellules normales, p. ex les molécules du soi. Ceci peut aboutir à la lyse d'un certain nombre de cellules tumorales (Moretta et al., 2008).

L'interaction de MICA et de MICB ainsi que de l'IL16-binding protein (ULBP) présents à la surface de nombreuses tumeurs malignes avec NKG2D sur la surface des NK est importante dans l'activation de la fonction cytotoxique des NK. En situation d'hypoxie, les molécules de type MIC ont tendance à se détacher de la surface de la cellule tumorale ce qui évidemment diminue la capacité de ces dernières de stimuler la cytotoxicité NK et en même temps la présence de MIC en libre en solution provoque la diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK entraînant évidemment une inactivation des NK. Par ailleurs l'augmentation de l'expression de la A disintegrin metalloprotéinase containing protein (ADAM) sous l'action de HIF-1  $\alpha$  en hypoxie diminue l'expression de MICA sur la surface tumorale ce qui renforce encore l'effet de l'immunoévasion NK (Barsoum et al., 2011; Siemens et al., 2008).

D'autres récepteurs activateurs que NKG2D à la surface des NK comme NKp46, NKp30 et NKp44 sont également modulés négativement sous l'effet HIF-1 $\alpha$  en hypoxie, renforçant encore la tendance de la tumeur à inactiver les NK même en présence de cytokines

activatrices comme IL-2, IL-15, IL-12 et IL-21. D'un autre côté, il est intéressant de noter que l'hypoxie ne semble pas capable d'affecter l'expression du récepteur de Fc-gamma le CD16 permettant donc toujours une action de type ADCC des NK (Balsamo et al., 2013). La régulation de l'activité des cellules NK est donc dépendante d'un large répertoire de récepteurs inhibiteurs et activateurs disposés à la surface des cellules NK. Les récepteurs activateurs reconnaissent des ligands induits par le stress, les pathogènes ou le cancer tandis que les récepteurs inhibiteurs se lient à des molécules présentes sur des cellules normales (Moretta et al., 2008).

Au-delà de leur action importante dans l'immunité innée, les NK sont également impliqués dans l'immunité adaptative de part leur action sur les lymphocytes T cytotoxiques (Paust et al., 2010; Zingoni et al., 2004). Il a été reconnu récemment que les cellules NK sont impliqués dans la réponse anti-tumorale par les lymphocytes cytotoxiques T par l'intermédiaire d'un mécanisme impliquant les cellules dendritiques (Amakata et al., 2001; Walzer et al., 2005). Par ailleurs, les cellules NK sont capables de reconnaître des cellules tumorales tentant d'évader à la surveillance des cellules T en exprimant des molécules du CMH aberrantes (Nielsen et al., 2012).

En plus de leur rôle bien décrit dans l'inhibition de la tumorigénèse précoce, les cellules NK sont également capables d'éradiquer de plus larges tumeurs. Pour cela, les tumeurs sont infiltrées par de grandes quantités de cellules NK en réponse à la sécrétion de cytokines activatrices comme l'IL-15 par la cellule tumorale. Une corrélation claire a été mise en évidence dans différents cancer entre le nombre de cellules NK infiltrant une tumeur et le pronostic vital (Senovilla et al., 2012).

Un autre lien entre l'hypoxie tumorale et la tolérance immunitaire des NKs impliquant les T régulateurs a été démontré récemment. En effet, le TGF- $\beta$  est secrété par les cellules tumorales sous microenvironnement hypoxique, ce qui provoque l'attraction et la prolifération de Treg dans le microenvironnement tumoral. Cette accumulation de Treg est bien connue pour provoquer une anergie NK par la diminution de l'expression de NKG2D à leur surface (Deng et al., 2013; Ghiringhelli et al., 2005).

Un autre mécanisme important de création d'un microenvironnement immunosuppresseur qui est actuellement de mieux en mieux exploité en clinique humaine, est celui lié aux immune checkpoint receptors comme le cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) et le programmed death receptor 1 (PD-1). Ces récepteurs sont à l'origine de boucles de contrôle négatifs jouant un rôle important dans la reconnaissance par le système immunitaire du soi et évitent ainsi l'apparition intempestive de réactions immunitaires anti soi, appelées également maladies autoimmunitaires. Tous les mécanismes régissant leur régulation et leur rôle exact dans l'immunosuppression tumorale est encore mal connue, mais on sait que le microenvironnement tumoral semble médier l'induction de PD-1 sur les cellules NK intratumorales (p. ex. dans le myélome), évitant ainsi l'activation de ces derniers et la cytotoxicité antitumorale (Benson et al., 2010)

### ***Rôle des microRNAs dans la régulation de NK***

Vu qu'il a été possible de détecter des mRNAs des ligands de NKG2D dans les tissus normaux, il a été postulé que des miRNAs pourraient jouer un rôle dans leur régulation à un niveau post transcriptionnel (Champsaur and Lanier, 2010). Partant de ce postulat, des

recherches ont été entreprises, et il a été possible de découvrir des miRNAs capables de réguler négativement MICA et MICB qui en cas de stress cellulaire ont tendance à être surexprimés. Il s'agit de miRNAs comme le miR-17-5p, miR-20a, miR-93, miR-106b, miR-372, miR-373, et le miR-520 qui sont tous également surexprimés dans diverses tumeurs et sont par ailleurs impliqués dans la progression tumorale et l'invasion (Stern-Ginossar et al., 2008). On peut donc parler d'un mécanisme d'immunoévasion tumoral médié par des miRNAs tumoraux. Par ailleurs, le miR-10b, un « metastamir » bien connu est reconnu comme capable de diminuer l'expression de MICB et donc de moduler négativement la cytotoxicité NK passant par l'activation de NKG2D (Tsukerman et al., 2012).

### **3.4. Les microvésicules tumorales**

Les microvésicules ont pour la première fois été décrites dans le plasma de patients cancéreux dans les années 1970 (Schifferli, 2011). Le rôle exact de ces microvésicules chez ces patients est toujours peu connu, mais il a été spéculé qu'ils pouvaient être liés à l'état procoagulant dans lequel ces patients se trouvent vu que les microvésicules contiennent des quantités importantes de facteur tissulaire, qui est évidemment fortement lié à l'activation non spécifique de la cascade de la coagulation dans le cancer (Tesselaar and Osanto, 2007). Cette hypothèse est renforcée par le fait que ces microvésicules sont produites en grande quantité par des plaquettes activées (Ay et al., 2009; Del Conde et al., 2005; Schifferli, 2011).

Les microvésicules constituent un groupe hétérogène de vésicules membranaires dont le diamètre peut passer de 0.1 à 1  $\mu\text{m}$  et sont impliquées dans la communication intercellulaire (Ratajczak et al., 2006). Cependant, la taille des microvésicules dépend très

largement des conditions dans lesquelles la cellule productrice se trouve, p. ex. une cellule en état de stress, comme l'hypoxie, produit des microvésicules largement plus petites mais plus nombreuses qu'en état non stressé.

En plus des microvésicules, les cellules eukaryotes secrètent également un autre type de vésicules extracellulaires appelées exosomes, ces exosomes ont une taille inférieure allant de 30 à 100 nm de diamètre. A l'instar des microvésicules, ces exosomes contiennent également des composants cytoplasmiques ainsi certaines protéines de surface (par exemple récepteurs) identiques à ceux de la membrane plasmatique de la cellule parentale. Ces exosomes semblent jouer un rôle important dans la présentation des antigènes ainsi que dans la mort de cellules cibles (Jorfi and Inal, 2013; Wolfers et al., 2001).

Il a été démontré que la plupart des cellules eucaryotes étaient capables de sécréter de telles microvésicules et un rôle putatif dans la communication intercellulaire au sens large leur a été rapidement attribué (Lee et al., 2012). Ces microvésicules peuvent être produites et secrétées par une multitude de cellules aussi diverses que les plaquettes, les neutrophiles, les réticulocytes, les macrophages, les mégacaryocytes, les monocytes, les lymphocytes B et T, les mastocytes, les cellules endothéliales ainsi que les cellules tumorales.

La sécrétion des microvésicules peut être spontanée ou suite à une stimulation extracellulaire et une augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (Hugel et al., 2005). Le processus de « vésiculation » permet le relargage sélectif de composants cellulaires dans le microenvironnement mais au cours de leur sécrétion les microvésicules absorbent également d'autres composants du cytoplasme de la cellule

parentale comme certaines protéines, des miRNAs, des mRNAs, protéines de surface etc. (Ratajczak et al., 2006). La composition des microvésicules, bien que leur membrane contienne nettement plus de phosphatidylsérine, ressemble donc largement à celle des cellules parentales.

Les microvésicules exercent leur fonction sur les processus biologiques de différentes manières, ils participent à la maintenance d'une physiologie cellulaire normale en agissant par exemple sur les cellules souches (Ratajczak et al., 2006), la réparation des tissus (Gatti et al., 2011), l'immunosurveillance (Raposo et al., 1996) et la coagulation (Del Conde et al., 2005). Un rôle plus spécifique dans la progression tumorale a également été suggéré pour les microvésicules. En effet, il a été suggéré que les microvésicules seraient impliquées dans l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules de la moelle osseuse, en y créant des niches capables de soutenir le développement de métastases (Muralidharan-Chari et al., 2010). Les cellules tumorales dans la tumeur primitive, secrèteraient alors des microvésicules capables d'attirer des cellules souches de la moelle qui dans la tumeur primitive ainsi que dans d'éventuels sites métastatiques créeraient un microenvironnement de cellules supportrices permettant à la tumeur de se développer et de résister aux attaques du système immunitaire, notamment en régulant l'activité des lymphocytes T reg (Szajnik et al., 2010).

#### **3.4.1 Rôle des microvésicules dans les métastases**

Dans le domaine de la dissémination métastatique des tumeurs, les microvésicules ont également été impliquées dans la formation de « niches » pré métastatiques, qui sont des endroits privilégiés et prédestinés à l'implantation de cellules tumorales détachées de la tumeur primitives et sur leur chemin à travers la circulation comme par exemple



dans le mélanome (Peinado et al., 2012; Rak and Guha, 2012). Ces études ont également montré que des vésicules secrétées à partir de cellules de mélanome pouvaient transférer MET (Hepatocyte growth factor receptor) à des cellules médullaires établissant ainsi le rôle des microvésicules dans le transfert d'information entre les cellules tumorales et les cellules normales. Par ailleurs, les microvésicules sont également capables de stimuler la progression de métastases déjà existantes en promouvant la croissance cellulaire (Al-Nedawi et al., 2009; Skog et al., 2008), l'angiogénèse (Al-Nedawi et al., 2009) et le remodelage de la matrice extracellulaire (Sidhu et al., 2004).

Différentes études ont pu démontrer pour la première fois dans un modèle de glioblastome en culture que l'expression du mRNA d'un EGFR muté a engendré la production d'un grand nombre de vésicules qui étaient même détectables dans le plasma des souris xéno greffées, et que ces vésicules étaient capables de transférer cet mRNA à des cellules environnantes (tumorales et endothéliales) entraînant la production notamment de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF. En plus, l'inhibition de l'incorporation des vésicules dans les cellules par le blocage de la phosphatidylsérine entraîne une diminution notable aussi bien de la croissance tumorale que de l'angiogénèse. (Al-Nedawi et al., 2009; Al-Nedawi et al., 2008).

### **3.4.2 Rôle des microvésicules dans la résistance aux médicaments anticancéreux**

Les microvésicules peuvent interagir à de nombreux niveaux avec les mécanismes de résistance tumorale. En effet des études démontrant leur interaction avec les voies de l'apoptose, de p53, ainsi que de de la P-gp (P-glycoprotein) (Zhang et al., 2014) ont été décrites.

Il a été montré que les cellules cancéreuses se débarrassent activement de leur caspase 3, une des principales enzymes impliquées dans la phase d'exécution de l'apoptose, en les secrétant par des microvésicules. Cette caspase 3 est alors présente dans les microvésicules issues uniquement de cellules viables, capables d'apoptose, mais non dans de vésicules issues de cellules déjà dans le processus d'apoptose. Dans ces dernières, le pool de caspase 3 est consommé et son pool diminue donc naturellement.

La sécrétion de la caspase 3 est donc une sorte de mécanisme de protection de la cellule contre l'apoptose (Chironi et al., 2009; Lee et al., 2011; Sarkar et al., 2009)

Par ailleurs, il est intéressant d'observer que les cellules insensibles à la chimiothérapie secrètent nettement plus de microvésicules en réponse au stress chimiothérapeutique et des microvésicules plus concentrées en drogue active que les cellules résistantes à la chimiothérapie (Safaei et al., 2005; Shedden et al., 2003).

### **3.4.3 Rôle des microvésicules dans la réponse immunitaire et l'immunoévasion**

En 1996 il a déjà été montré que des vésicules extracellulaires étaient capables d'induire une réponse immunitaire adaptative par l'intermédiaire de la présentation d'antigènes par la CMH de classe II. Le rôle d'exosomes contenant à leur surface ce CMH a été rendu responsable de cette présentation, mettant des microvésicules au centre de mécanismes immunologiques essentiels (Raposo et al., 1996).

En plus des actions de microvésicules secrétées par les cellules tumorales, on a pu montrer que les macrophages associés aux tumeurs secrètent des microvésicules contenant des miRNAs qui favorisent les capacités d'invasion des cellules tumorales mammaires (Yang et al., 2011a). Par ailleurs, il a été montré que dans certaines conditions

les microvésicules étaient aussi capables d'interagir avec le système immunitaire en stimulant la fonction des cellules T régulatrices, d'inhiber la fonction des cellules NK (Clayton et al., 2008) et des lymphocytes T cytotoxiques (Clayton et al., 2007) et d'inhiber la maturation de monocytes en cellules dendritiques (Eken et al., 2008).

Il a été également montré que l'activation du complément induisait la sécrétion de microvésicules (Elward et al., 2005), et que ceci était à la base d'un mécanisme de protection des cellules soumis à un stress extérieur (Sims et al., 1988). Le même mécanisme semble être en cause dans la protection de cellules cancéreuses contre la lyse par le complément. Les cellules cancéreuses exportent de grands nombres de vésicules exprimant à leur surface un composant du complément qui est le CD46. Le CD46 a une activité de cofacteur des composants C3b et C4b du complément et protège ainsi la cellule contre la lyse par le complément (Al-Nedawi et al., 2009; Riley-Vargas et al., 2004).

Un autre exemple de défense active des cellules tumorales contre le système immunitaire adaptatif est le fait que les cellules tumorales expriment et secrètent de vésicules contenant le FAS ligand (CD95L) qui est capable d'induire une apoptose rapide des lymphocytes T exprimant le récepteur de mort cellulaire FAS (Abrahams et al., 2003).

#### **3.4.4 Rôle des microvésicules dans la délivrance de médicaments**

En considérant toutes les propriétés de ces microvésicules, de leur sécrétion et de leur absorption par différentes cellules, il est évidemment très tentant d'imaginer un grand nombre d'applications potentielles en thérapeutique humaine. Ceci est particulièrement

intéressant au vu du manque criant de vecteurs thérapeutiques utilisables chez l'humain et surtout capables de cibler leur cargo.

Le concept d'utiliser des microvésicules à ces fins a été pour la première fois mis en pratique en 2010 où des monocytes transfectés par le miR-150 ont été utilisés pour faire migrer des cellules endothéliales (Zhang et al., 2010). Ce principe a pu être confirmé plus tard dans de multiples modèles (Akao et al., 2011; Olson et al., 2012; Pan et al., 2012). Un autre groupe a utilisé le même principe en transfectant des cellules dendritiques immatures avec des plasmides codant pour la protéine exosomale LAMP-2 (lysosomal associated membrane protein 2, ou CD107b) et la protéine RVG (rabies virus glycoprotein) qui est une protéine spécifique du cerveau. Ces exosomes « adressés » au cerveau étaient alors chargés avec un siRNA contre la GAPDH et on a pu observer des réponses RNAi très puissantes surtout au niveau du cerveau des souris, mais seulement de façon très marginale dans les autres organes et aucun effet secondaire n'a pu être observé. (Alvarez-Erviti et al., 2011; El-Andaloussi et al., 2012)

Il est par contre évident que si ce concept fonctionne chez la souris on n'en est qu'au tout début en ce qui concerne l'applicabilité à l'homme. Une étude récente a néanmoins jeté les bases à une possible application anticancéreuse. En effet on a utilisé des exosomes contenant des siRNAs anti EGFR dans un modèle de cellules de cancer mammaire xéno greffe dans des souris. L'adressage est ici obtenu grâce à l'utilisation sur les cellules productrices d'exosomes (et donc aussi sur la membrane de ces derniers) d'un « platlet derived growth factor » ou PDGF fusionné au peptide GE11, ce qui donne lieu à un ligand de EGFR capable de diriger les exosomes. La capacité d'activation de l'EGFR par cette

protéine de fusion est par contre très nettement moins importante que celle de EGF. Dans ce modèle, on a ainsi pu montrer que les exosomes sont capables de délivrer leur cargaison dans les cellules tumorales dans un modèle complexe comme celui d'une souris xéno greffée (Ohno et al., 2013).

On peut donc dire que les microvésicules sont des vecteurs d'information intercellulaire importants. Ils sont capables de véhiculer aussi bien des informations sous forme protéique, que sous forme de RNA, et ces informations sont de nature à potentiellement changer le phénotype des cellules receveuses. Les microvésicules ont ainsi été impliquées dans de nombreux processus physiologique ou pathologiques, et de nombreuses manières d'interférer avec ces processus par l'intermédiaire des microvésicules sont envisageables et envisagés. Par ailleurs, de part leur présence dans la circulation, les microvésicules peuvent également agir comme biomarqueur, ou vecteur de biomarqueur rendant accessible ceux-ci à une simple prise de sang. Les microvésicules sont donc promises à un avenir très prometteur dans les domaines aussi bien de la thérapeutique que de la médecine prédictive.

## **But de l'étude**

Au cours des dernières décennies, de grandes avancées ont été faites dans nos connaissances en cancérologie, certains mécanismes régissant la cancérogénèse, la progression tumorale, l'invasion et les métastases et l'évasion des mécanismes de mort cellulaire ont été faits. De grands progrès ont ainsi pu être faits dans la thérapeutique anticancéreuse avec notamment des approches cytotoxiques plus pertinentes et plus efficaces et des approches par des petites molécules inhibant diverses tyrosines kinases reconnues comme « drivers » dans certains patients.

C'est en grande partie grâce à l'émergence de la médecine plus personnalisée que ces avancées ont été possibles. La recherche de mutations causales dans certains patients a permis en effet de les traiter « à la carte » en leur délivrant une molécule capable d'enrayer le mécanisme causal de leur progression tumorale et d'ainsi prolonger significativement leur survie.

Dans certaines maladies comme le leucémie myéloïde chronique ou le sarcome stromal gastro-intestinal GIST, qui sont des maladies avec une seule altération causale, cette stratégie permet de contrôler très durablement la maladie, dans la plupart des autres maladies cancéreuses par contre de nombreux mécanismes redondants sont à l'œuvre et il faut de nombreuses stratégies médicamenteuses simultanées pour en venir à bout.

Depuis une dizaine d'années, les efforts dans le domaine de l'immunité et de la cytotoxicité antitumorale ont enfin été récompensés par les premiers résultats cliniques obtenus par les inhibiteurs « checkpoint » comme les stratégies anti CTLA4 et PD1/PD-L1. En dépit de ces avancées les tumeurs rechutent malheureusement de façon inéluctable et le système immunitaire, même libéré de ses capacités de tolérance au prix de

l'émergence de diverses maladies autoimmunitaires, n'est toujours pas capable d'endiguer la maladie cancéreuse de façon durable.

Il est évident dans ce contexte que le microenvironnement tumoral, longtemps négligé, est d'une importance cruciale si nous voulons comprendre comment la cellule tumorale réussit à éviter la destruction par le système immunitaire.

Ce microenvironnement est en grande partie plongé dans une hypoxie relative voir prononcée, causée par une angiogénèse tumorale suboptimale, et ajoute ainsi à l'agressivité tumorale et à sa résistance aux agents thérapeutiques.

Vu que notre groupe et d'autres avaient déjà montré que le microenvironnement hypoxique était capable de bloquer la réponse immunitaire tumorale aux CTLs par un mécanisme impliquant l'autophagie, et que nous et d'autres avons également montré que les cellules tumorales secrètent des microvésicules dans le milieu de culture et la circulation sanguine, nous nous sommes demandés quel influence ces microvésicules tumorales secrétées en condition d'hypoxie pouvaient avoir sur le microenvironnement tumoral.

Notre hypothèse était que ces microvésicules allaient influencer les cellules NK au sein de ce microenvironnement tumoral et entraîner une immunoévasion tumorale. Nous avons tenté de découvrir quel contenu de ces microvésicules était le plus susceptible d'entraîner cette immunoévasion. Par ailleurs nous nous sommes demandé si l'autophagie tumorale en hypoxie influençait la cytotoxicité NK et par quel mécanisme cette cytotoxicité pouvait être entravée.



Le projet global de cette thèse était donc d'essayer d'élucider l'influence des microvésicules hypoxiques sur le microenvironnement tumoral et sur l'immunoévasion des cellules NK.

## Résultats

**1. Article 1: Hypoxic tumor-derived microvesicles alter natural killer cell cytotoxicity by a mechanism involving TGF- $\beta$  and miR23a transfer.**

**Guy BERCHEM**<sup>\*†</sup>, Muhammad Zaeem NOMAN<sup>\*</sup>, Manon BOSSELER<sup>†</sup>, Jérôme PAGGETTI<sup>†</sup>, Sonia BACONNAIS<sup>‡</sup>, Eric LE CAM<sup>‡</sup>, Arash NANBAKSH<sup>\*</sup>, Etienne MOUSSAY<sup>†</sup>, Fathia Mami Chouaib<sup>\*</sup>, Bassam JANJI<sup>†</sup> and Salem CHOUAIB<sup>\*</sup>.

*Submitted to Journal of Immunology*

## Résumé de l'article 1

**Les microvésicules secrétées par les cellules tumorales hypoxiques inhibent la cytotoxicité des cellules NK par un mécanisme impliquant le transfert de TGF- $\beta$  et de miR-23a.**

Le microenvironnement tumoral est bien connu pour ses propriétés de résistance aux médicaments ainsi que pour la promotion de l'invasion et des métastases. (Barker et al., 2013; Wang et al., 2013; Wang et al., 2014). Des études récentes ont déjà montré que le microenvironnement tumoral peut être rendu immunotolérant par un échange de microvésicules entre la tumeur et le système immunitaire (Liu et al., 2013; Muturi et al., 2013).

Dans ce travail, nous avons montré que la réponse immunitaire anti-tumorale des cellules NK est très significativement modifiée par des microvésicules dérivées des cellules tumorales hypoxiques. En effet les microvésicules tumorales hypoxiques sont morphologiquement très semblables à celles produites en normoxie, mais contiennent au moins deux facteurs immunomodulateurs impliqués dans le contrôle de la cytotoxicité NK in vitro et in vivo. Il s'agit du TGF- $\beta$  et du miR-23a, qui lors de leur incorporation dans les cellules NK provoquent une diminution de l'expression des récepteurs activateurs des NKs, le NKG2D ainsi que la protéine LAMP1/CD107a.

Nous avons pu montrer que les microvésicules hypoxiques sont capables de pénétrer les cellules NK tout aussi bien que les microvésicules normoxiques, et que ceci ne peut donc pas être à la base de l'effet observé par les microvésicules hypoxiques. Nous avons donc postulé que l'effet observé était dû au contenu de ces microvésicules. Bien que les

hypothèses émises par certains auteurs, disant que certains facteurs solubles comme PGE-2/COX pourraient être à la base de la baisse du granzyme B, de la perforine et de l'IFN- $\gamma$  dans les lymphocytes T et que cela causerait un effet immunoévasif (Hodge et al., 2014), nous pensons que les cellules NK sont au moins co-responsables de cet effet par le mécanisme que nous décrivons.

LAMP1/CD107a aussi bien que IFN- $\gamma$  ont été décrit précédemment comme marqueur de la dégranulation des cellules NK, et nous montrons ici que la diminution de la cytotoxicité NK est directement lié à une expression diminuée de ces deux acteurs et qui diminuent donc la dégranulation des cellules NK.

Par ailleurs le TGF- $\beta$  est bien connu comme facteur immunosuppresseur impliqué dans l'immunoévasion (Alter et al., 2004; Gorelik and Flavell, 2001; Thomas and Massague, 2005), et les effets immunosuppresseurs de TGF- $\beta$  comprennent la répression de cytokines comme IFN- $\gamma$ , ainsi que l'inhibition de l'activation, de la prolifération et de la dégranulation des lymphocytes T (Hayashi et al., 2003; Li et al., 2006; Thomas and Massague, 2005). Le TGF- $\beta$  diminue à un niveau transcriptionnel la production de perforine, de granzyme-A et B, de Fas ligand et de IFN- $\gamma$  dans les lymphocytes T cytotoxiques (Thomas and Massague, 2005) et à un niveau post transcriptionnel TGF- $\beta$  réduit la stabilité du mRNA de IFN- $\gamma$ , ce qui évidemment diminue également la disponibilité de cette cytokine (Hayashi et al., 2003). Enfin le TGF- $\beta$  induit une répression du récepteur activateur des cellules NK, le NKG2D (Crane et al., 2010). Nos résultats, montrant que les microvésicules hypoxiques et non les microvésicules normoxiques induisent une diminution importante des récepteurs NKG2D à la surface des cellules NK, ce qui est donc tout à fait dans la ligne des observations précédentes.

Fort de ces observations nous postulons donc que les microvésicules tumorales produites en état d'hypoxie sont à la base de la diminution de la cytotoxicité des cellules NK observée et que ceci est en partie médié par le transfert de TGF- $\beta$  des cellules tumorales vers les cellules NK. Cette hypothèse est supportée par les faits suivants que nous avons observés, i) le niveau de TGF- $\beta$  dans les cellules tumorales hypoxiques et les microvésicules correspondantes, est plus élevé que en situation normoxique, ii) le traitement de cellules NK par ces microvésicules hypoxiques produit une diminution significative de NKG2D, de LAMP1/CD107a et de IFN- $\gamma$  ainsi que une diminution de la cytotoxicité des cellules NK, et iii) la diminution de NKG2D, de LAMP1/CD107a et de IFN- $\gamma$  ainsi que la diminution de la cytotoxicité NK, ne sont plus observés quand le TGF- $\beta$  est inhibé par un anticorps bloquant.

Nous nous sommes alors demandés si le TGF- $\beta$  était le seul facteur impliqué dans la répression de, NKG2D et IFN- $\gamma$  dans les cellules NK, et ainsi de la diminution de la cytotoxicité NK dans notre système, ou si d'autres facteurs pouvaient être en cause. En effet, une étude récente a montré que TGF- $\beta$  était capable d'induire l'expression de miR-23a dans des cellules T CD8+, et que ce miR-23a était capable de cibler le 3'UTR du mRNA de, ce qui se traduit par un effet immunosuppresseur sur les cellules T CD8+. Dans notre système nous avons pu montrer que le miR-23a était significativement induit dans les microvésicules contenant du TGF- $\beta$ , ce qui nous a amené à proposer deux mécanismes non mutuellement exclusifs pour expliquer la diminution de la cytotoxicité NK par les microvésicules tumorales hypoxiques. Le premier étant la diminution de l'expression de NKG2D par TGF- $\beta$  comme décrit précédemment (Crane et al., 2010), et le deuxième la

diminution de LAMP1/CD107a par l'intermédiaire de miR-23a, qui quant à lui peut être induit par TGF- $\beta$  comme décrit précédemment (Chandran et al., 2014b).

Cette étude montre donc pour la première fois que les cellules tumorales en hypoxie (contrairement à celles produites en normoxie) sont capables d'induire un microenvironnement immunosuppresseur autour d'eux par la sécrétion de microvésicules chargées de médiateurs immunomodulateurs, et qu'ils sont ainsi capables d'« éduquer » les cellules NK et de diminuer leur capacités à réagir contre la tumeur.

**Hypoxic tumor-derived microvesicles alter natural killer cell cytotoxicity by a mechanism involving TGF- $\beta$  and miR23a transfer**

Guy BERCHEM<sup>\*\*†</sup>, Muhammad Zaeem NOMAN<sup>\*</sup>, Manon BOSSELER<sup>†</sup>, Jérôme PAGGETTI<sup>†</sup>, Sonia BACONNAIS<sup>‡</sup>, Eric LE CAM<sup>‡</sup>, Arash NANBAKSH<sup>\*</sup>, Etienne MOUSSAY<sup>†</sup>, Fathia Mami Chouaib<sup>\*</sup>, Bassam JANJI<sup>†</sup> and Salem CHOUAIB<sup>\*</sup>.

\*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 753. Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France.

†Laboratory of Experimental Hemato-Oncology, Department of Oncology, Public Research Center for Health, Luxembourg City, Luxembourg.

‡ Maintenance des génomes, et microscopies moléculaires UMR 8126, Signalisation, noyaux et innovations en cancérologie, CNRS–Université Paris Sud. Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France.

**Corresponding author**

Salem CHOUAIB

E. mail: chouaib@gustaveroussy.fr

Phone: +33 1 42 11 45 47

Fax: +33 1 42 11 52 88

**Running title:** Hypoxic tumor-derived microvesicles impair NK cell function

**Keywords:** microvesicles, hypoxia, natural killer cells, NKG2D, LAMP-1, TGF- $\beta$ , miR-23a

This work was supported by the ARTuR (Association pour la Recherche sur les Tumeurs du Rein), ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) 2012-2013 : N° SFI20121205624, and Grant from CRP-Santé (LHCE-2013 11 05).



## Abstract

Tumor derived microvesicles (TD-MVs) are key mediators by which cancer cells can sensitize neighboring cells in the tumor microenvironment. Recently, it was reported that extracellular vesicles composed of exosomes and MVs promote breast cancer cell invasion and metastasis. Here, we demonstrated that MVs derived from hypoxic tumor cells qualitatively differ from those derived from normoxic tumor cells in terms of the content carried by the MVs. We showed that hypoxic TD-MVs package two immunomodulatory factors involved in the impairment of natural killer (NK) cell cytotoxicity against different tumor cells *in vitro* and *in vivo*. We further showed that following their uptake by tumor cells, hypoxic TD-MVs transfer TGF- $\beta$  to NK cells, impairing the cell surface expression of the activating receptor NKG2D, thereby affecting NK cell cytotoxicity. MiRNA profiling performed on normoxic and hypoxic TD-MVs revealed the presence of high levels of miR-23a in hypoxic TD-MVs. We showed that miR-23a operates as an additional immunomodulatory factor, since it directly targets the expression of CD107a in NK cells. To our knowledge, this is the first study to show that hypoxic tumor cells can export their immunosuppressive phenotype to NK cells in the tumor microenvironment through the secretion of MVs carrying immunomodulating factors. We further postulate that by secreting MVs, hypoxic tumor cells can educate NK cells and decrease their antitumor immune response. This study highlights the existence of a novel mechanism of immune suppression mediated by hypoxic TD-MVs and further improves our understanding of the immunosuppressive features of the hypoxic tumor microenvironment.

## **Introduction**

The hypoxic tumor microenvironment has recently been shown to play a major role in inducing immunosuppressive conditions necessary for both cytotoxic T-lymphocyte (CTL)-mediated tumor cell lysis and natural killer (NK) cell-dependent lysis (Baginska et al., 2013; Butt and Mills, 2014; Noman et al., 2011; Vitale et al., 2014). Specifically, it has been shown that hypoxic tumor cells are able to produce cytokines such as tumor necrosis factor or stromal cell-derived factor-1, which attract potent immunosuppressive CD45+ myeloid cells into the tumor bed (Mantovani et al., 2008), affecting NK cytotoxicity (Murdoch et al., 2004). Moreover, we have very recently demonstrated that hypoxia selectively up-regulates PD-L1 on MDSCs via HIF-1 $\alpha$ , and that under hypoxia stress, blockade of PD-L1 abrogates MDSC function by modulating their cytokine production (Noman et al., 2014). CTL-mediated cytotoxicity is also inhibited by hypoxia through a cooperation between STAT3 and HIF-1 and the involvement of autophagy. (Levine et al., 2011; Noman et al., 2009; Noman et al., 2011; Tartour et al., 2011; Wang et al., 2004; Yu et al., 2007)

Several lines of evidence support the notion that tumor cells communicate directly with immune cells in the tumor microenvironment (Muralidharan-Chari et al., 2010) and that this process fosters suppression of immunosurveillance. Recently, it has been reported that one of the major modes of communication between cancer and immune cells may involve tumor-derived (TD) microvesicles (MVs), which have been considered as prognostic or predictive biomarkers in several different cancers (Antonyak and Cerione, 2014; Muralidharan-Chari et al., 2010).

At least two different types of extracellular vesicles have been described, categorized according to their size and the way they are secreted. Exosomes are smaller sized vesicles (50–150 nm) generated within multivesicular bodies that fuse with the cell membrane and thus are released into the extracellular space. MVs are larger vesicles (150–1 000 nm) formed through budding and fission of the cell membrane through a mechanism mediated by the actin cytoskeleton (D'Souza-Schorey and Clancy, 2012; Muralidharan-Chari et al., 2010).

MVs carry lipids, proteins, mRNAs, and miRNAs (Martins et al., 2013; Schifferli, 2011), which can be delivered to target immune cells in order to control tumor-associated immune responses by a mechanism which is not fully understood. Exosomes can act as tumor promoters by educating non-malignant cells to provide a tumor-supporting microenvironment, which helps to circumvent immune detection by the host and promotes metastasis. However, tumor-derived exosomes with anti-tumor and immune-activating properties have also been described, reflecting the complexity and different functions of TD-MVs. Due to their ability to carry tumor antigens towards dendritic cells for CTL priming, TD-MVs have been described as immune stimulators (Andre et al., 2002; Wolfers et al., 2001). Moreover, it has been reported that NK cells had their activating receptors (CD69, NKG2D, and NKp44) upregulated and their inhibitory receptor (CD94) downregulated upon incubation with TD-MVs bearing heat shock protein (Hsp) (Lv et al., 2012). MVs are nevertheless more often associated with immune evasion by tumor cells. In this regard, MICA-containing MVs have been reported to markedly decrease NK cell cytotoxicity by inhibiting NKG2D on NK cells (Clayton and Tabi, 2005). It has also been shown that acute myeloid leukemia patients have large numbers of MVs containing TGF-

$\beta$ 1, and MICA/B in their serum, and that this is related to immune suppression in these patients (Szczepanski et al., 2011; Whiteside, 2013).

Recently, hypoxia has been described as a regulator of MV formation in tumor cells. Specifically, hypoxic human breast cancer cells were shown to produce large amounts of TD-MVs by a mechanism involving HIF-dependent expression of the small GTPase RAB22A. In this model, incubation of naive breast cancer cells with hypoxic MVs promoted focal adhesion formation, invasion, and metastasis (Wang et al., 2014). These data imply that MVs derived from hypoxic tumor cells may reflect the hypoxic status of tumor cells by carrying messengers affecting NK cell function. In this study, we provide evidence that hypoxic, but not normoxic, TD-MVs regulate NK cell function by transferring TGF- $\beta$  and miR-23a involved in targeting CD107a, and hence impairing their cytotoxicity.

## **Materials and methods**

### **Cell culture and antibodies**

The IGR-Heu lung carcinoma cell line was derived and maintained in culture as previously described (Noman et al., 2009). K562, NK92, and NKD cell lines were purchased from the American Type Culture Collection and cultured in their respective media. Hypoxic stress conditions were generated in a hypoxia workstation (Invivo2 400, Ruskinn, Belgium), as previously described (Noman et al., 2009). All antibodies used in this study were obtained from eBioscience.

### **Preparation of normoxic and hypoxic MVs and transmission electron microscopy (TEM)**

All cells were grown at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in adequate medium with 10% exosome depleted FBS. Exosome-free FBS was prepared by ultracentrifugation overnight at 100 000 × *g* and 4°C. After 48 h, medium was collected and centrifuged at 400 × *g* for 5 min, 2 500 × *g* for 20 min, 4 500 × *g* for 20 min, and 10 000 × *g* for 1 h at 4°C to pellet MVs. The pellet was washed and suspended in PBS. For hypoxic MVs, cells were grown for 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> under normoxia and their medium was changed before incubation for 48 h at 37°C under hypoxic conditions (pO<sub>2</sub> = 0.1%).

MV were analyzed by TEM using negative staining method. 5 microliters of MVs suspended in PBS was adsorbed onto a 300 mesh copper grid coated with a collodion film covered by a thin carbon film, activated by glow-discharge. After 1 min, grids were washed with aqueous 2% (w/vol) uranyl acetate (Merck, France) and then dried with ashless filter paper (VWR, France). TEM observations were carried out on a Zeiss 912AB

transmission electron microscope in filtered low loss mode. Electron micrographs were obtained using a ProScan 1024 HSC digital camera and Soft Imaging Software system.

#### **Determination of MV size by Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) analysis**

TRPS analysis was used to measure the size of MVs after isolation from culture supernatants. A NP400 nanopore was fitted onto the qNano (Izon Science) and measures were performed using standard electrolyte buffer (SEB, Izon Science) as an electrolyte. Beads of 350 nm (Izon Science) served for calibration. All measures were performed with similar stretch and voltage and analyzed using Izon Control Suite.

#### **Flow cytometry analysis**

Flow cytometry was performed using a LSR-II flow cytometer (BD Biosciences) and indicated antibodies. Data were further analyzed by FACS DIVA 7.0 or Flow Jo 7.6.5 software.

#### **MV uptake experiments**

TD-MVs were purified as described above from normoxic and hypoxic cells, stained with PKH67, and added to PKH-26-stained recipient cells. After 16 h, recipient cells were analyzed by confocal microscopy.

#### **ELISA for human TGF- $\beta$ 1**

Human IFN- $\gamma$  or TGF- $\beta$ 1 was measured in normoxic and hypoxic cells or MVs using the TGF- $\beta$ 1 ELISA kit (eBioscience).

### **<sup>51</sup>Cr cytotoxicity assay**

The cytotoxic activity of NK cells was measured by a conventional 4-hour <sup>51</sup>Cr release assay as previously described (Noman et al., 2009).

### **RNA isolation and SYBR-GREEN qRT-PCR**

Total RNA was extracted from cells and MVs with TRIzol solution (Invitrogen). DNase I-treated total RNA (1 µg) was converted into cDNA using TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems) and mRNA levels were quantified by the SYBR-GREEN qPCR method (Applied Biosystems). Relative expression was calculated by using the comparative Ct method (2-DCt). Primer sequences are available upon request.

### **MicroRNA analysis**

The Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) for small RNA (small RNA chips) was used to assess small RNA profiles in cells and MVs. MicroRNA profiling of normoxic and hypoxic MVs was performed using the TaqMan® Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0 (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol.

### **miR-23a blockade and overexpression**

Transfections were conducted with anti-miR-23a (miR inhibitor, Ambion) and pre-miR-23a (miR precursor, Ambion). siPORT NeoFx Transfection Agent (NeoFx; Ambion) was used for transfection according to manufacturer's instructions. AntimiR-CT (miR negative control, Ambion) and pre-miR-CT (miR positive control, Ambion) were used as controls.

### **Luciferase reporter assay for miR-23a target gene**

Vector containing 3'-UTR of LAMP-1 was obtained from GeneCopoeia (Nivelles, Belgium). NK-92 cells expressing empty vector or vector encoding 3'-UTR were co-transfected with either pre-miR-control or pre-miR-23a using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in OPTIMEM (Invitrogen) medium. After 48 hours, firefly and Renilla luciferase activities were measured using the LucPair™ Duo-Luciferase Assay Kit (GeneCopoeia) according to the manufacturer's instructions.

### **Statistics**

Data were analyzed with GraphPad Prism. Student's *t*-test was used for single comparisons. Data were considered statistically significant when P was less than 0.05.



## Results

### **Normoxic and hypoxic tumor cell-derived MVs display similar sizes and both are taken up by NK cells**

TEM performed on MVs derived from IGR-Heu and K562 tumor cells revealed that both cells secrete vesicles displaying characteristic shape of MVs. No significant difference in the shape of normoxic and hypoxic MVs was observed (Figure 1A). In addition, MV size distribution analysis performed using qNano technology demonstrated that normoxic and hypoxic MVs displayed sizes ranging between 160 and 600 nm (Figure 1B). These results indicate no significant difference in the size of MVs derived from normoxic and hypoxic tumor cells. MVs were further characterized for their surface expression of LAMP-1 and MHC-I. We did not observe any significant difference in the surface expression of these MV markers between normoxic and hypoxic MVs derived from both IGR-Heu and K562 cells (Figure 1C).

To determine whether TD-MVs are taken up by NK cells, NK92 cells were stained with PKH26 (red) and incubated with PKH67-stained TD-MVs (green) isolated from normoxic and hypoxic IGR-Heu and K562 tumor cells. Figure 1D shows that although K562-derived MVs penetrate NK-92 cells more efficiently than IGR-Heu-derived MVs, there was no significant difference in the uptake of normoxic and hypoxic MVs derived from the same tumor cell line.

### **Hypoxic TD-MVs impair NK-mediated cytotoxicity**

As no difference in the uptake of normoxic and hypoxic TD-MVs was observed, we next investigated whether NK cells co-cultured with normoxic or hypoxic MVs displayed different levels of cytotoxicity. To address this issue, IGR-Heu and K562 tumor cells were co-cultured with NK-92 or NKD cells, untreated or treated with either normoxic or hypoxic TD-MVs, at different effector:target ratios. Figure 2A shows that treatment of NK-92 or NKD cells by either normoxic or hypoxic TD-MVs significantly decreased their cytotoxicity toward naive IGR-Heu or K562 tumor cells. Interestingly, the decrease in the cytotoxicity of NK cells was significantly higher when NK cells were stimulated with hypoxic compared to normoxic TD-MVs.

As CD107a and IFN- $\gamma$  expression are established markers of NK cell functional activity (Vivier et al., 2008), we therefore assessed the expression of these markers in NK cells unstimulated or stimulated with normoxic or hypoxic TD-MVs. Figure 2B shows a direct correlation between the decrease in the cytotoxicity and the expression of CD107a and IFN- $\gamma$  by NK-92 and NKD cells.

### **The impairment of NK-mediated cytotoxicity by hypoxic tumor-derived MVs involves a decrease in NKG2D induced by tumor growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

The function of NK cells is finely tuned by a balance between signals delivered by activating and inhibitory receptors following their respective interaction with activating and inhibitory ligands (Long et al., 2013). We investigated whether hypoxia can modulate NK ligand expression on both tumor cells and TD-MVs. As shown in Figure 3A, we did not observe any significant effect of hypoxia on the expression of major NK ligands on IGR-Heu and K562 tumor cells and their derived MVs. This result indicates that the decreased

NK cell function we observed is not due to altered expression of NK ligands on hypoxic TD-MVs.

It has recently been reported that tumor-derived TGF- $\beta$  down-regulates the activating receptor NKG2D and thereby impairs the cytotoxicity of NK cells (Crane et al., 2010). To investigate whether hypoxic TD-MVs affect the cytotoxicity of NK cells by a mechanism involving TGF- $\beta$ -dependent down-regulation of NKG2D expression, we first analyzed whether hypoxic stress induces the expression of TGF- $\beta$  in tumor cells. Our results (Supplementary Figure 1) showed a time-dependent increase in the expression of TGF- $\beta$  at both mRNA and protein level in hypoxic IGR-Heu and K562 tumor cells. Accordingly, the level of TGF- $\beta$  detected in the supernatant and the MVs of hypoxic cells was significantly higher than in normoxic cells (Figure 3B). We therefore evaluated the effect of this increase in TGF- $\beta$  on the expression of NKG2D at the surface of NK cells. Figure 3C shows that treatment of NK-92 and NKD cells with MVs derived from hypoxic, but not normoxic, IGR-Heu and K526 tumor cells significantly decreases the expression of NKG2D on the surface of NK cells. Interestingly, the decrease in NKG2D was no longer observed when hypoxic TD-MVs were pre-treated with anti-TGF- $\beta$  blocking antibody. Overall, our data indicate that hypoxic TD-MVs impair the cytotoxicity of NK cells by decreasing the expression of NKG2D in a TGF- $\beta$ -dependent manner.

This data is further supported by our results showing that the decrease in the cytotoxicity of NK-92 and NKD cells observed following treatment with hypoxic TD-MVs was restored by anti-TGF- $\beta$  blocking antibody (Figure 4A). The restoration of NK cell cytotoxicity also resulted in restoration of IFN- $\gamma$  production by NK-92 and NKD cells (Figure 4B and C).

## **Hypoxic tumor derived MVs contain different levels of miRNAs compared to normoxic MVs**

In addition to proteins, TD-MVs and exosomes contain mRNAs and microRNAs that can be taken up by other cells, including NK cells. Some miRNAs could target transcripts coding key proteins involved in the function of NK cells, such as CD107a, levels of which were found to be decreased by hypoxic TD-MVs. To determine whether the impairment of NK cell cytotoxicity by hypoxic TD-MVs involves additional miRNA-mediated mechanisms, we analyzed the miRNA profile of normoxic and hypoxic TD-MVs isolated from IGR-Heu cells. Results of Figure 5A point to the presence of small RNAs, most likely corresponding to miRNAs, in both normoxic and hypoxic MVs. Figure 5B shows that, compared to normoxic MVs, hypoxic MVs displayed 20 up-regulated and 44 down-regulated miRNAs with a change greater than 2-fold. As expected, we found that hypoxia-induced miR-210 was increased by 3.33-fold in hypoxic MVs. More interestingly, we showed that miR-23a was increased by 4.67-fold in hypoxic compared to normoxic TD-MVs. In silico prediction of putative miR-23a target genes using the TargetScan database (<http://www.targetscan.org>) revealed the presence of an miR-23a binding site at position 116–123 in the 3'-UTR of the CD107a gene (Figure 5C). This result indicates that miR-23a in hypoxic MVs could inhibit NK cell function by targeting CD107a. The overexpression of miR-210 and -23a, but not -23b and -27b, in hypoxic MVs isolated from IGR-Heu, K562 and T1 tumor cells, was further validated by real time PCR (Figure 5D).

## **miR-23a-containing hypoxic TD-MVs impair NK-cell cytotoxicity by targeting CD107a**

To address the relative contribution of miR-210 or miR-23a to the impairment of NK cell cytotoxicity, we transfected NK cells with pre-miR-210 and -23a and assessed their in vitro cytotoxic function and the expression of CD107a, IFN- $\gamma$ , and granzyme B (GzmB). While pre-miR-210 did not affect the cytotoxicity of NK cells (Supplementary Figure 2), the transfection of pre-miR-23 (Figure 6A) significantly decreased the cytotoxicity of NK cells toward IGR-Heu, K562, and T1 tumor cells at different effector:target ratios (Figure 6B). The decrease in NK cell cytotoxicity was not related to the regulation of NK cell activating receptors (Supplementary Figure 3), but most likely related to the ability of miR-23a to target the mRNA expression of CD107a (Figure 6C). This result was further supported by our data showing that the transfection of miR-23a in NK cells significantly decreased the expression of CD107a at their surface when co-cultured with K562 target cells (Figure 6D).

To validate that miR-23a targets CD107a, we conducted a luciferase reporter assay using a vector containing LAMP-1 (CD107a) 3'-UTR. Transfection of pre-miR-23a in cells expressing 3'-UTR LAMP-1 vector significantly reduced luciferase activity by more than 60% compared to control empty vector (Figure 6E), suggesting that miR-23a directly binds to the 3'-UTR of LAMP-1 and targets CD107a expression in NK92 cells.

We next assessed whether hypoxic TD-MVs reduce the cytotoxicity of NK cells by decreasing the expression of CD107a following miR-23a transfer. To address this issue, hypoxic TD-MVs isolated from IGR-Heu, K562, and T1 cells were transfected with either anti-miR-control or anti-miR-23a. Real time PCR demonstrated a decrease in miR-23a expression in hypoxic MVs transfected with anti-miR-23a, but not with anti-miR-control (Figure 7A). The effect of transfected MVs on the activity of NK cells was further investigated according to the experimental design described in Figure 7B. Briefly,

normoxic and hypoxic MVs were isolated from IGR-Heu, K562, and T1 tumor cells. NK-92 cells were treated with either normoxic or hypoxic MVs, untransfected or transfected with anti-miR-23a. NK cells treated with different MVs were next co-cultured with target tumor cells and their cytotoxicity was evaluated in terms of expression of CD107a, IFN- $\gamma$ , GzmB, and perforin at the mRNA and protein level. Figure 7C shows that the decrease in CD107a mRNA expression in NK cells treated with hypoxic MVs was no longer observed when NK cells were treated with hypoxic MVs transfected with anti-miR-23a. This effect is specific to CD107a, as the expression of IFN- $\gamma$ , GzmB, or perforin was not affected by anti-miR-23a, even though hypoxic MVs decreased the expression of GzmB in NK cells. The results depicted in Figure 7D confirms that the decrease in the percentage of CD107a and IFN- $\gamma$ -positive NK cells by hypoxic MVs was restored when MVs were transfected with pre-miR-23a.

## Discussion

The hypoxic tumor microenvironment has previously been described to be associated with drug resistance, invasion, and metastasis (Barker et al., 2013; Wang et al., 2013; Wang et al., 2014). Here, we show that hypoxic, but not normoxic, TD-MVs impair the NK cell-mediated anti-tumor immune response. This finding is consistent with several previous reports describing the exchange of MVs between tumors and the immune system (Liu et al., 2013; Muturi et al., 2013), which ultimately leads to the establishment of an immunotolerant microenvironment. An important issue that arises from this result is whether the effect of hypoxic MVs is due to a difference in their ability to enter NK cells compared to normoxic MVs, or whether it is due to a difference in their contents. Electron microscopy combined with TRPS analysis revealed that the shape and the size of normoxic and hypoxic TD-MVs are roughly similar. In addition, no difference in the uptake of normoxic and hypoxic MVs by NK cells was observed. Based on these data, it is tempting to speculate that the effect of hypoxic MVs on NK cell function could be related to the content of the MVs, and thus to their ability to transfer suppressive factors to NK cells. Further, the content of MVs may reflect the hypoxic status of tumor cells. This could partly explain why some highly aggressive tumor types, such as lung (Hodge et al., 2014), melanoma (Greenberg et al., 2014; Schatton et al., 2014) and breast (Maeda et al., 2014; Soliman et al., 2014) evade the host immune system. Indeed, Hodge et al recently hypothesized that soluble factors such as PGE-2/COX could be responsible for the decreased expression of GzmB, perforin, and IFN- $\gamma$  in T-cells, NKT-like and NK cells, thereby inducing lung cancer immune evasion (Hodge et al., 2014). In keeping with this, we strongly believe that TD-MVs could play a role as a carrier for these soluble factors

involved in the regulation of the cytotoxicity of NK cells. In this regard, CD107a and IFN- $\gamma$  have been described as markers of NK cell degranulation and activity, respectively (Alter et al., 2004). In accordance with this, we provide evidence that the decrease in the cytotoxicity of NK cells correlates with a significant decrease in the expression of CD107a and IFN- $\gamma$ . It is worth noting that NK cell cytotoxicity was also slightly impaired by normoxic TD-MVs and that this impairment was correlated with a modest decrease in CD107a and IFN- $\gamma$ . While further investigations are needed to determine the mechanism underlying this slight decrease by normoxic MVs, it is unlikely that this is related to a difference in the uptake of normoxic and hypoxic MVs by NK cells, as both normoxic and hypoxic MVs are taken-up by NK cells with the same efficiency. We further hypothesize that the differential effect of normoxic and hypoxic TD-MVs could be related to the concentration of inhibitory factors contained in MVs.

TGF- $\beta$  is a potent immunosuppressive factor involved in immune escape (Gorelik and Flavell, 2001; Thomas and Massague, 2005). Immune inhibitory effects of TGF- $\beta$  include induction of regulatory T cells, impairment of antigen presentation, down-regulation of immunostimulatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , and inhibition of T-cell activation, proliferation, and degranulation (Hayashi et al., 2003; Li et al., 2006; Thomas and Massague, 2005). Furthermore, it has been reported that TGF- $\beta$  inhibits the production of perforin, granzyme A, GzmB, Fas ligand, and IFN- $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T cells at a transcriptional level (Thomas and Massague, 2005). At the post-transcriptional level, TGF- $\beta$  has been described to induce a decrease in IFN- $\gamma$  by reducing its mRNA stability in a murine NK cell line (Hayashi et al., 2003). More recently, TGF- $\beta$  has been described as a potent down-regulator of NKG2D activating receptors at the surface of NK cells (Crane et



al., 2010). In line with these studies, our results showed that hypoxic, but not normoxic, MVs dramatically decrease NKG2D at the surface of NK cells. Consistent with these results, it is tempting to speculate that hypoxic TD-MVs are able to impair NK cell cytotoxicity via the delivery of TGF- $\beta$  to NK cells. Several of the results reported here support such a mechanism: **i)** the level of TGF- $\beta$  in hypoxic cells and in their derivative MVs is significantly higher compared to normoxic cells; **ii)** treatment of NK cells with hypoxic MVs containing high concentrations of TGF- $\beta$  induces significant decreases in NKG2D, CD107a, and IFN- $\gamma$  and results in a dramatic decrease in their cytotoxicity; and **iii)** the decrease in cytotoxicity, and in the levels of NKG2D, CD107a, and IFN-g, was no longer observed when TGF- $\beta$  was inhibited by anti-TGF- $\beta$  blocking antibody.

Although our data establish a link between an increase of TGF- $\beta$  and a decrease in NK cell cytotoxicity, an important question that remains is whether TGF- $\beta$  is the only factor involved in the downregulation of CD107a, IFN- $\gamma$ , and NKG2D in NK cells. Indeed, a recent study highlights that TGF- $\beta$  promotes the expression of the miR-23a cluster in human CD8<sup>+</sup> T cells, which subsequently and specifically targets the 3'-UTR of CD107a/LAMP1 mRNA. Importantly, this study also revealed that the miR23a cluster is not only induced by TGF- $\beta$ , but also exerts a suppressive effect on CD8<sup>+</sup> T-cell effector function, even in the absence of TGF- $\beta$  signaling (Chandran et al., 2014b). In accordance with this study, we revealed that miR-23a was significantly upregulated in hypoxic TD-MVs containing high levels of TGF- $\beta$ . Our data emphasize that hypoxic TD-MVs impair NK cell cytotoxicity by at least two mechanisms that are not-mutually exclusive: **i)** by a mechanism involving a decrease in NKG2D expression by TGF- $\beta$  as previously described (Crane et al., 2010); and **ii)** by decreasing CD107a expression following miR23a transfer.

Therefore, it cannot be ruled out that the increased expression of miR-23a observed in hypoxic MVs could be associated with an increased level of TGF- $\beta$  in hypoxic tumor cells, as previously described in CD8+ T cells (Chandran et al., 2014b).

It has recently been reported that in breast cancer cells, hypoxia induces an increase in MV release, and hypoxic MVs promote invasion and metastasis (Wang et al., 2014). However, whether there are qualitative differences regarding the specific cargo carried by MVs generated from hypoxic compared to non-hypoxic cells remains to be established (Wang et al., 2014). Our study provides clear evidence that TD-MVs can reflect the hypoxic status of tumor cells by carrying immunosuppressive molecules involved in the impairment of NK cell function not only in vitro but also in vivo. Indeed, we showed (Supplementary Figure 4) that NK cells isolated from draining lymph nodes of mice treated with hypoxic TD-MVs display a decreased level of CD107a, IFN- $\gamma$ , and GzmB. Overall, our data provide a new mechanism by which hypoxic stress impairs the anti-tumor immune response by the transfer of suppressive signals to immune cells via MVs.

## Figure legends

### **Figure 1: Characterization of normoxic and hypoxic tumor-derived microvesicles (MVs).**

**A)** Transmission electron microscopy analysis of the shape of normoxic and hypoxic MVs derived from IGR-Heu and K562 tumor cells.

**B)** Analysis of the size range of normoxic and hypoxic MVs derived from IGR-Heu and K562 tumor cells determined by Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) analysis. Results show the percentage of MVs corresponding to each size range.

**C)** Surface expression of LAMP-1 and MHC-I on normoxic and hypoxic TD-MVs from IGR-Heu and K562 cells. Data are reported as a percentage of positive cells (upper lines) and mean fluorescence intensity (MFI) (lower lines).

**D)** Analysis of MV uptake by confocal microscopy. Normoxic and hypoxic MVs derived from IGR-Heu and K562 tumor cells were stained with PKH67 (green) and incubated with PKH26-labeled natural killer (NK)-92 cells. Control condition (Ctrl) corresponds to NK-92 cells incubated without MVs. The Upper panels represent phase contrast images, the two middle panels represent PHK26 and PKH67-stained NK cells, and the lower panels represent a merge of upper and middle panels and the uptake of PKH67-TD-MVs. Bar: 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2: The effect of normoxic and hypoxic tumor-derived microvesicles (MVs) on the activity of natural killer (NK) cells.**

**A)** Cytotoxicity of NK cells against tumor cells. NK-92 (*upper panels*) or NKD (*lower panels*) cells, untreated (Ctrl) or treated with normoxic (Normoxic MVs) or hypoxic (Hypoxic MVs) MVs derived from IGR-Heu (*left panels*) or K562 (*right panels*) cells. Untreated or MV-treated NK cells were co-cultured with IGR-Heu or K562 tumor cells and the percentage of tumor cells lysed was assessed by conventional 4-h <sup>51</sup>Cr release assays at different effector:target ratios (30:1, 10:1, or 3:1). Data represent three independent experiments with standard deviation (SD). Statistically significant difference (indicated by asterisks) in NK-mediated lysis between tumor cells incubated with normoxic and hypoxic MVs are shown (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.005).

**B)** The expression of CD107a and IFN- $\gamma$  in NK-92 (*left panels*) or NKD (*right panels*) cells, untreated (Ctrl) or treated with MVs as described in A. Data are reported as a percentage of positive cells for 3 independent experiments with SD. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the expression of CD107a and IFN- $\gamma$  between tumor cells incubated with normoxic and hypoxic MVs are shown (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.005; \*\*\* P < 0.0005).

**Figure 3: Expression of natural killer (NK) cell ligands on the surface of tumor cells and their derived microvesicles (MVs).**

**A)** Surface expression of NK ligands at the surface of normoxic or hypoxic IGR-Heu and K562 tumor cells (left) and their derived MVs (right). Data are reported as a percentage of positive cells (upper lines) and mean fluorescence intensity (MFI) (lower lines).

**B)** Quantification of TGF- $\beta$  in normoxic and hypoxic cells and their derived MVs. IGR-Heu or K562 cells were cultured under normoxia (N) or hypoxia for 24, 48, or 72 h. TD-MVs from normoxic (N) or 24 h hypoxic (H) tumor cells were isolated as described in the Materials and Methods section. The quantification of TGF- $\beta$  in cells and MVs was performed by ELISA and data were reported as pg TGF- $\beta$  per mg of cell lysate or MVs. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the level of TGF- $\beta$  between in normoxic and hypoxic cells and in their derived MVs are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*  $P < 0.0005$ ).

**C)** The expression of NKG2D at the surface of NK cells. NK-92 (upper) or NKD (lower) cells cultured in the absence (Ctrl) or presence of normoxic (N MVs) or hypoxic (H MVs), untreated (-) or pre-treated (+) with anti-TGF- $\beta$  blocking antibody or with its corresponding isotype. The expression of NKG2D at the surface of NK cells was reported as a percentage of positive cells of three independent experiments with standard deviation. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the expression of NKG2D are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*  $P < 0.0005$ ).

**Figure 4: effect of blocking TGF- $\beta$  on the cytotoxicity of natural killer (NK) cells**

**A)** Cytotoxicity of NK-92 (left panels) or NKD (right panels) cells against IGR-Heu (upper panels) or K562 (lower panels) tumor cells. NK cells cultured in the absence (Ctrl) or presence of normoxic (MV normoxia) or hypoxic (MV hypoxic) microvesicles (MVs), untreated or pre-incubated with anti-TGF- $\beta$  blocking antibody (+TGF- $\beta$ ) or its corresponding isotype (+Isotype). Untreated or MV-treated NK cells were co-cultured with IGR-Heu or K562 tumor cells and the percentage of tumor cell lysis was assessed as described in Figure 2A. A statistically significant differences (indicated by asterisks) in NK-mediated lysis between hypoxic tumor cells treated with isotype or TGF- $\beta$ 1 blocking antibody are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ ; ns, not significant).

**B)** Effect of blocking TGF- $\beta$  on the expression of IFN- $\gamma$  by NK cells. The expression of IFN- $\gamma$  in NK-92 (upper panel) or NKD (lower panel) cells, cultured in the absence (Ctrl) or presence of normoxic (N) or hypoxic (H) MVs, untreated (-) or pre-treated (+) with anti-TGF- $\beta$  blocking antibody or its corresponding isotype. Data are reported as a percentage of positive cells of three independent experiments with standard deviation. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the percentage of IFN- $\gamma$  positive cells are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ).

**C)** Effect of blocking TGF- $\beta$  on the secretion of IFN- $\gamma$  by NK cells. The quantification of IFN- $\gamma$  was performed by ELISA on NK-92 (upper panel) or NKD (lower panel) cells described in B. Data are reported as pg IFN- $\gamma$ /ml. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the amount of IFN- $\gamma$  are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ).

**Figure 5: Profiling of micro-RNA in microvesicles (MVs) containing exosomes derived from hypoxic and normoxic IGR-Heu cells.**

**A)** Bio-analyzer of small nucleic acid content of normoxic (upper) or hypoxic (lower) MVs containing exosomes

**B)** miRNA profiling of MVs containing exosomes derived from normoxic or hypoxic tumor cells using Taqman miRNA array. Data analysis revealed the presence of 20 up-regulated and 44 down-regulated miRNAs in hypoxic compared to normoxic MVs-contained exosomes with a change greater than 2-fold.

**C)** Mapping of has-miR-23a on the mRNA 3'-UTR of LAMP1 (source TargetScan: <http://www.targetscan.org>)

**D)** Validation of the expression of miRNAs identified by Taqman miRNA array. Real time PCR analysis of miR-23a, miR-210, miR-23b, and let-27b expression in normoxic and hypoxic MVs derived from IGR-Heu, K562, and T1 tumor cells. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the expression of miR-23a and -210 are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*  $P < 0.0005$ ).

**Figure 6: Effect of miR-23a on the cytotoxicity of natural killer (NK) cells**

**A)** Effect of pre-miR-23a transfection on the expression of miR-210 in NK cells. NK-92 cells were untransfected (UT) or transfected with pre-miR control (pre-miR-Ctrl) or different concentrations of pre-miR-23a. Cells were subjected to real time PCR analysis for the expression of miR-23a (upper panel); miR-210 (middle panel) and miR-27a (lower panel) used as control.

**B)** Cytotoxicity of NK-92 cells expressing pre-miR-23a. NK-92 cells, transfected as described in A, were co-cultured with IGR-Heu (upper panel); K562 (middle panel), or T1 (lower panel) cells and the percentage of tumor cell lysis was assessed at different effector:target ratios (30:1, 10:1 or 3:1) as described in Figure 2A. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the cytotoxicity of NK cells expressing pre-miR-Ctrl and pre-miR-23a are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ).

**C)** Real time PCR analysis of LAMP1, IFN- $\gamma$ , GzmB, and PFN mRNA expression in NK-92 cells untransfected (UT) or transfected with either pre-miR control (Ctrl) or pre-miR-23a. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the expression of LAMP1, IFN- $\gamma$ , GzmB, and PFN in NK cells expressing pre-miR-Ctrl and pre-miR-23a are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ ; ns, not significant).

**D)** The expression of CD107a, IFN- $\gamma$ , and GzmB in NK-92 cells transfected pre-miR-Ctrl or pre-miR-23a and cultured alone or in the presence of K562 target cells. Statistically significant differences (indicated by asterisks) are shown (\*\*,  $P < 0.005$ ; ns, not significant).



**E)** Luciferase reporter gene assay performed using NK-92 cells co-transfected with either pre-miR control (Ctrl) and control vector or pre-miR-23a and vector encoding 3'-UTR of LAMP1. After 48 h, firefly and renilla luciferase activities were measured using the Dual-Luciferase Reporter assay and the ratio of firefly/renilla luciferase was determined. Statistically significant differences (indicated by asterisks) are shown. The experiment was performed in triplicate and repeated two times with the same results. Error bars indicate standard deviation. Statistically significant differences (indicated by asterisks) are shown (\*\*,  $P < 0.005$ ).

**Figure 7. Targeting miR-23a restores the cytotoxicity of natural killer (NK) cells treated with hypoxic tumor derived microvesicles (MVs)**

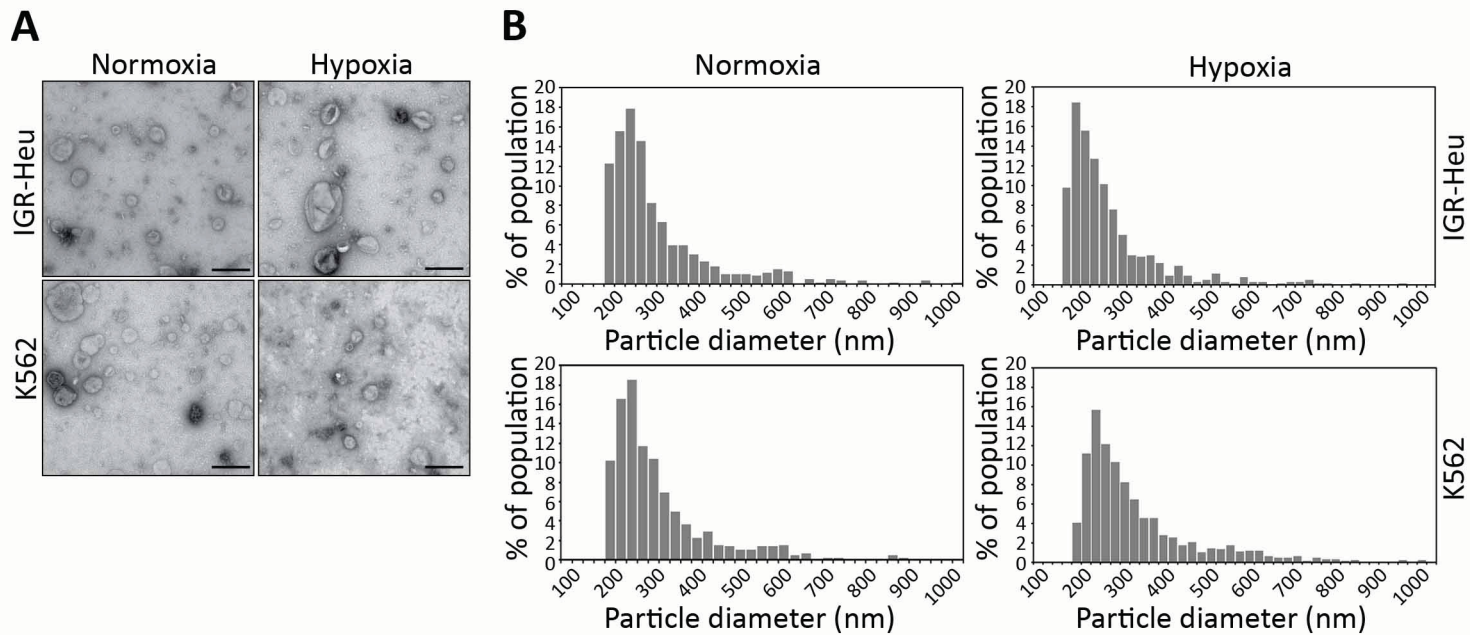
**A)** Real time PCR analysis of the expression of miR-23a. Normoxic (N) or hypoxic MVs derived from IGR-Heu, K562, and T1 tumor cells were untransfected (-) or transfected (+) with anti-miR control (anti-miR-Ctrl) or anti-miR-23a. Results are reported as a ratio between miR-23a and RNU44 (used as housekeeping gene). Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the expression of miR-23a are shown (\*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ ).

**B)** Schematic representation of the experimental design used to analyze the effect of targeting miR-23a expression in hypoxic MVs on the cytotoxicity of NK cells. Normoxic and hypoxic MVs were isolated from indicated the tumor cells cultured under normoxic

or hypoxic conditions. Untransfected normoxic MVs and hypoxic MVs transfected with anti-miR-23a were incubated with NK-92 cells. Following co-culture with tumor cells, NK cells were sorted and their function evaluated in term of cytotoxicity and the expression of CD107a, IFN-g, GzmB, and perforin.

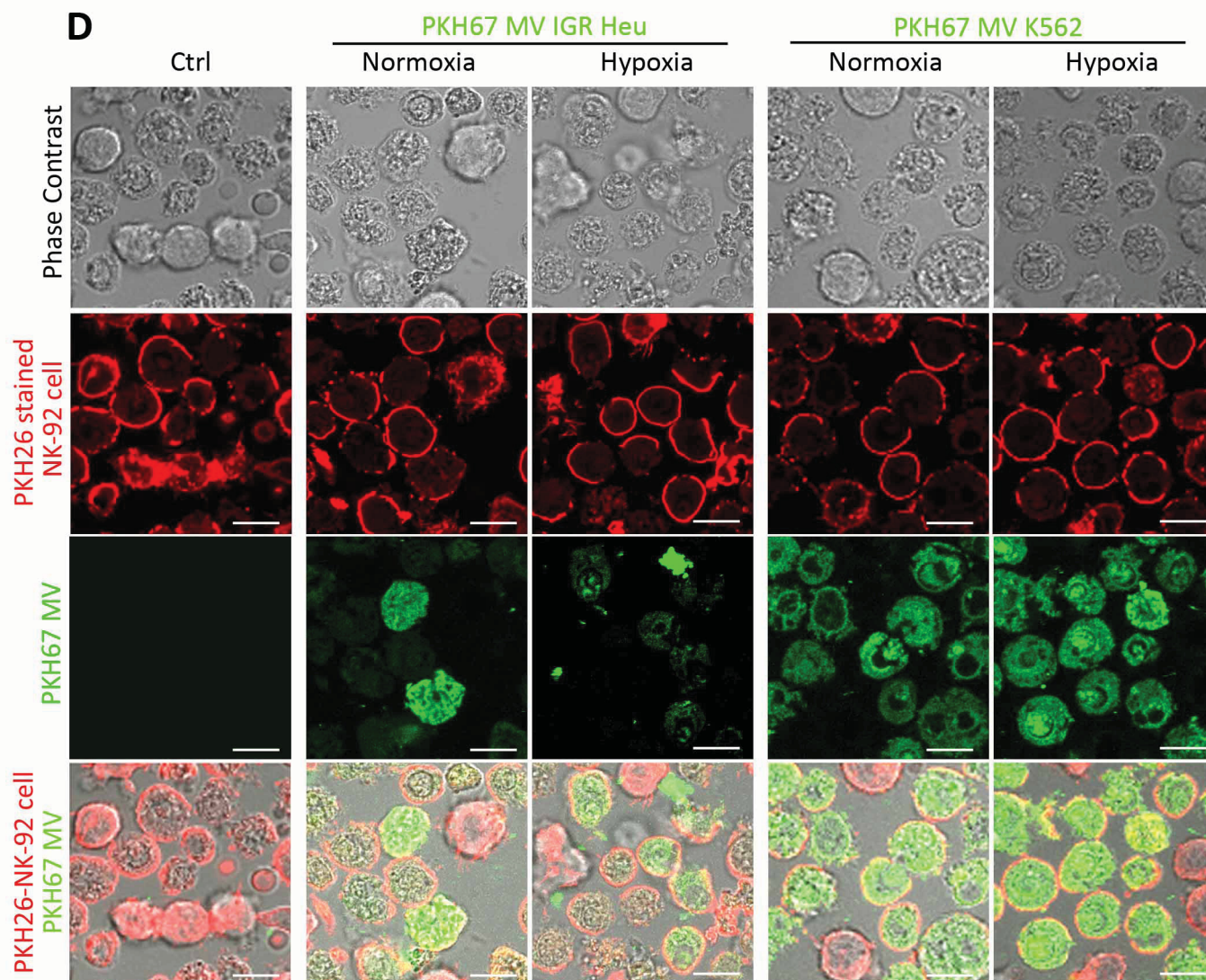
**C)** Real time PCR analysis of the mRNA expression of CD107a (LAMP1), IFN- $\gamma$ , Granzyme B (GzmB), and perforin (PFN) in NK-92 cells treated with normoxic or hypoxic MVs, untransfected or transfected with either anti-miR control (+anti-miR-Ctrl) or anti-miR-23a (+anti-miR-23a) derived from IGR-Heu (upper), K562 (middle) or T1 (lower) tumor cells. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the expression of LAMP1, IFN- $\gamma$ , GzmB, and PFN are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ ; ns, not significant).

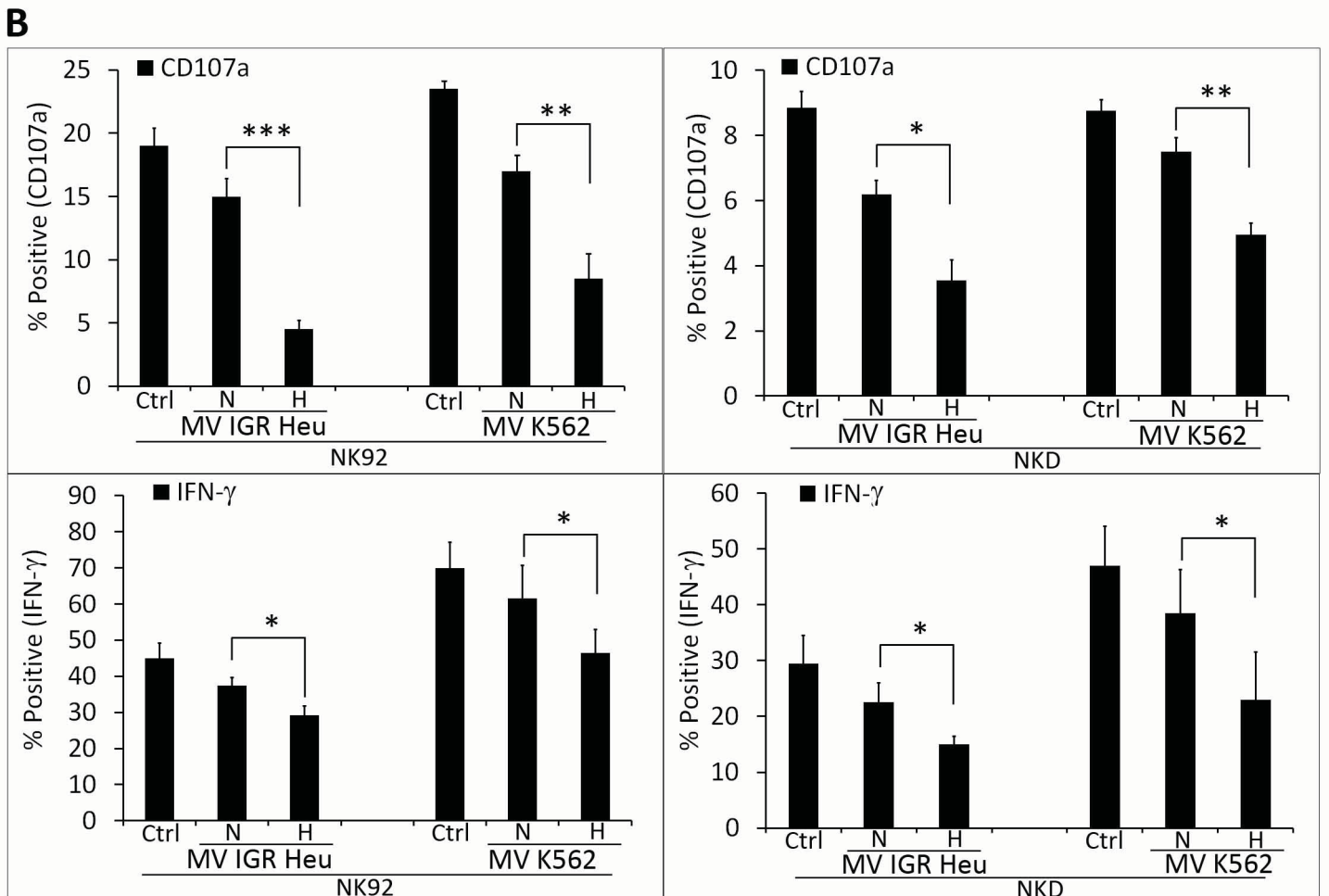
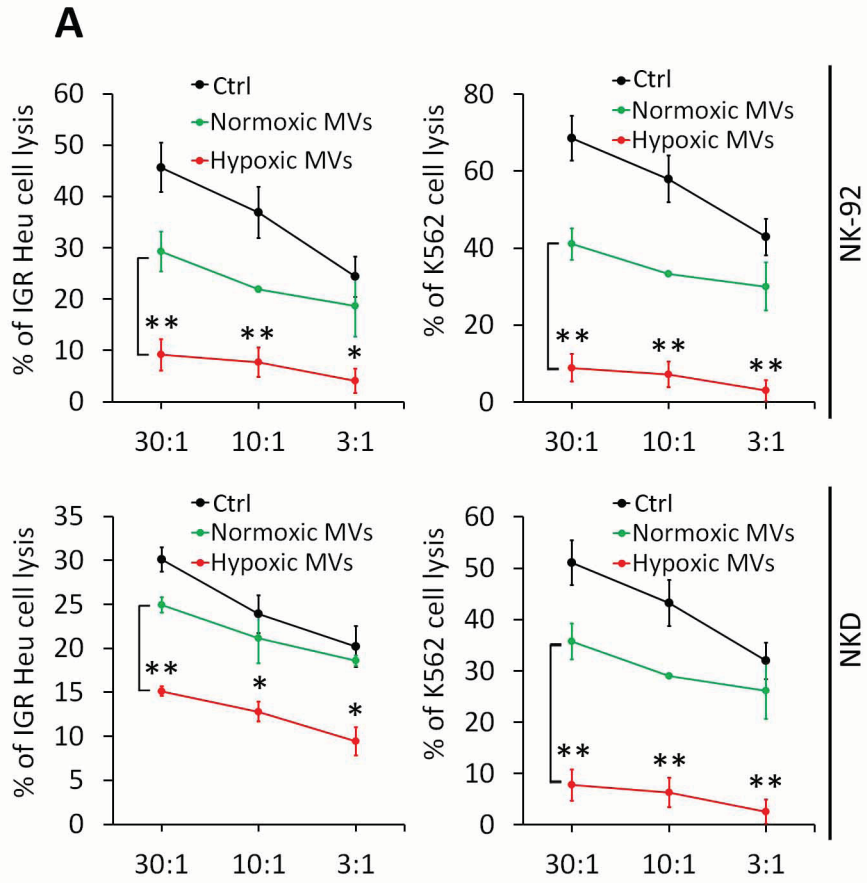
**D)** Intra-cytoplasmic staining of CD107a (upper) and IFN-g (lower) in control (Ctrl) NK-92 cells or in cells untreated (-) or treated (+) with normoxic (N) or hypoxic (H) MV derived from indicated tumor cell lines. Statistically significant differences (indicated by asterisks) in the percentage of CD107a and IFN- $\gamma$  positive cells are shown (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; ns, not significant).



**C**

	IGR-Heu				K562			
	LAMP-1		MHC-I		LAMP-1		MHC-I	
	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia
Microvesicles								
% of positive cells	25%	30%	35%	60%	40%	43%	65%	68%
Mean Fluorescence Intensity (MFI)	4221	3699	7555	5153	5421	5299	4444	4899

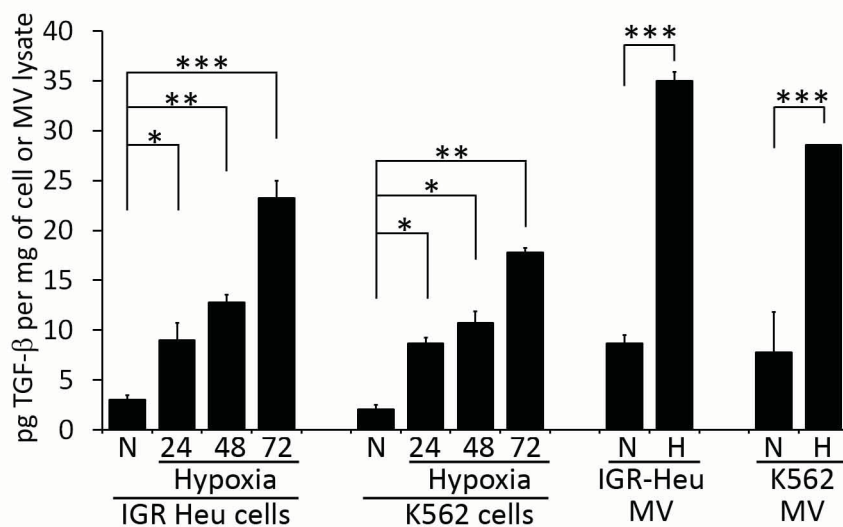




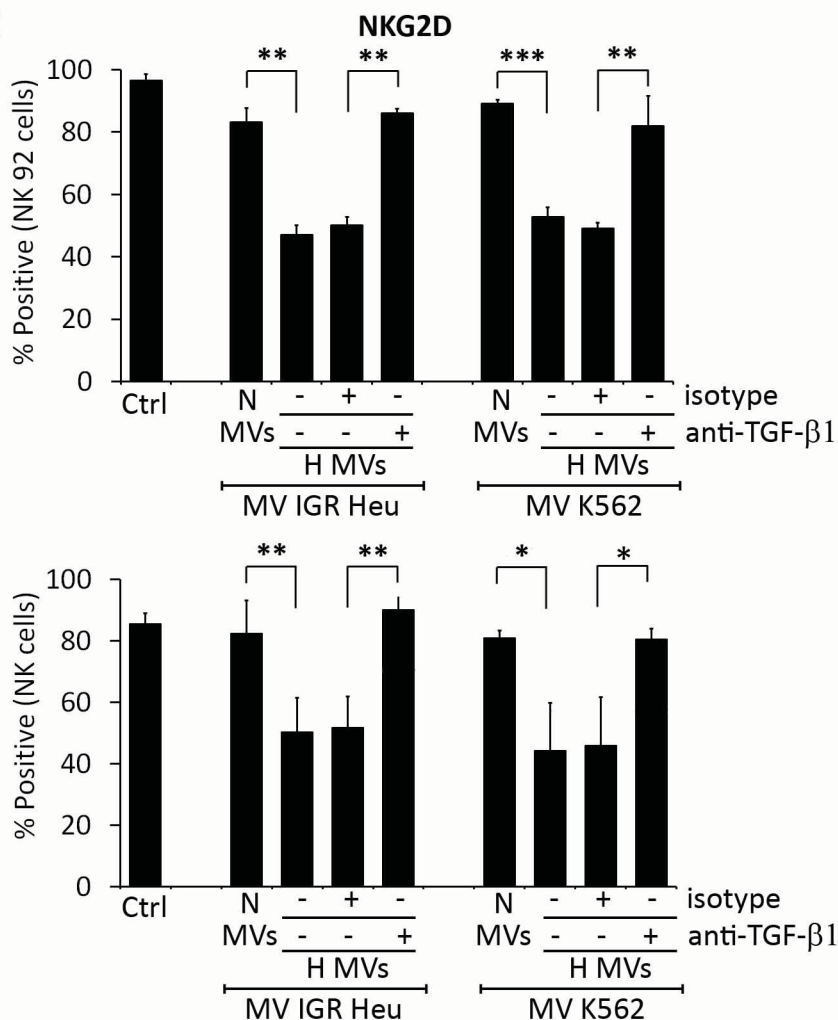
**A**

	NK Ligands (Cells)					NK Ligands (MVs)			
	IGR-Heu		K562			IGR-Heu		K562	
	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia		Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia
<b>MICA/B</b>	33.8% 1204	40.30% 1334	24.00% 2850	30.20% 3090	<b>MICA/B</b>	18% 2761	18.20% 2858	15.90% 2797	23.20% 3128
<b>PVR</b>	98.80% 6299	95.4% 5917	45.00% 3170	49.50% 2999	<b>PVR</b>	26.80% 2858	32% 2974	33.30% 3069	29.50% 2920
<b>ULBP-1</b>	32.1% 1191	45.1% 1519	8.50% 3370	6.90% 3870	<b>ULBP-1</b>	30% 1291	35% 1255	42.50% 1620	41.60% 1520
<b>ULBP-2</b>	4.4% 978	26.0% 1199	22% 1170	33% 1269	<b>ULBP-2</b>	8% 875	10.40% 950	25% 1289	32% 1370
<b>ULBP-3</b>	8.50% 1011	5.00% 2141	2.2% 3680	3.40% 3380	<b>ULBP-3</b>	6.50% 2011	5.80% 2059	5% 2231	5.10% 2100

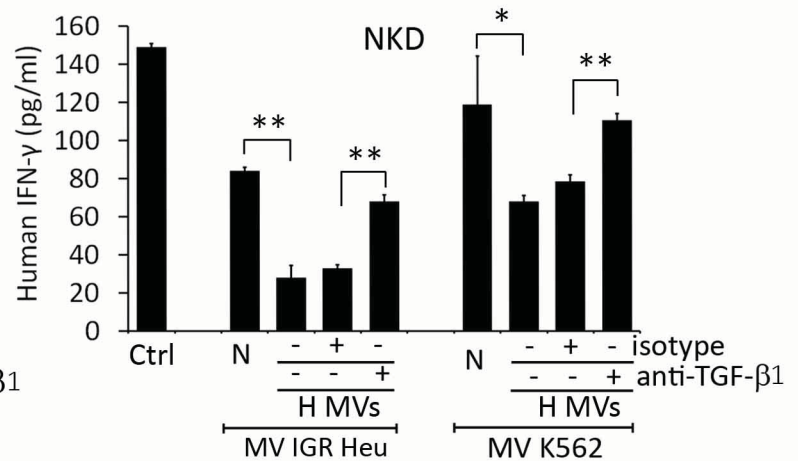
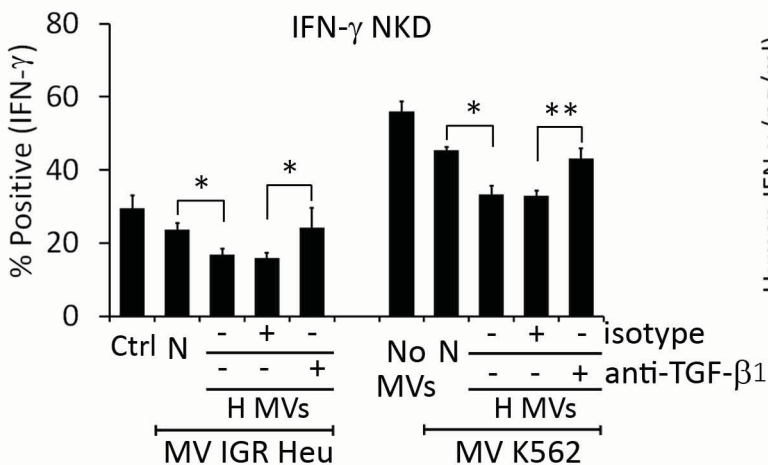
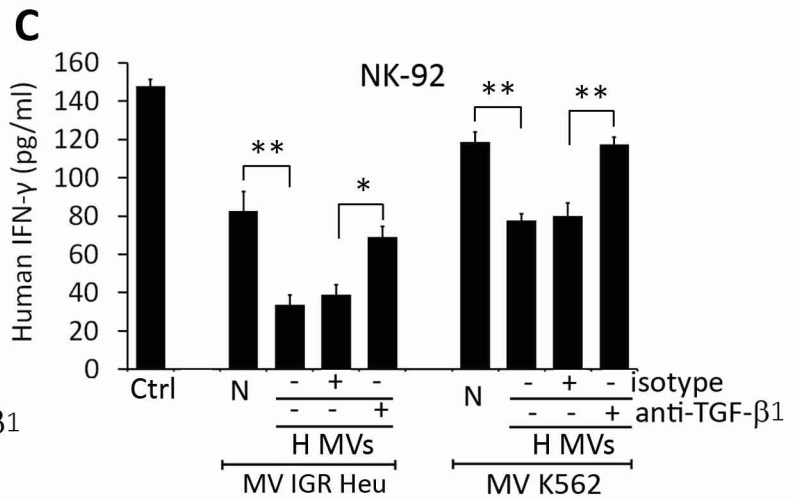
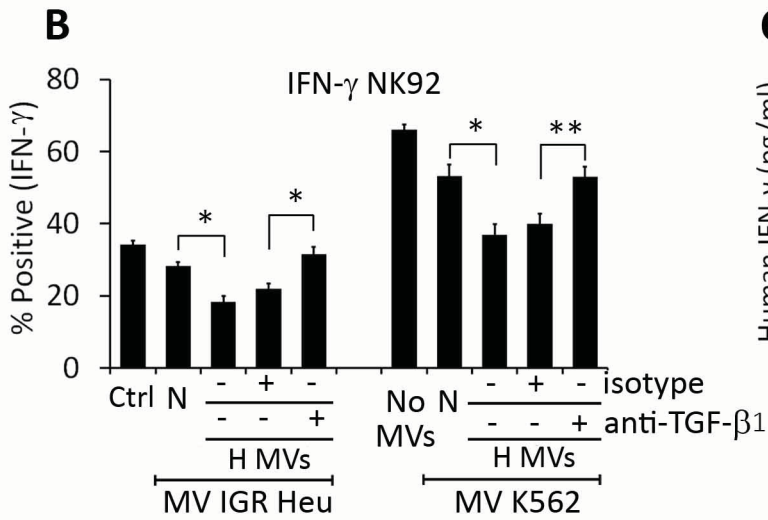
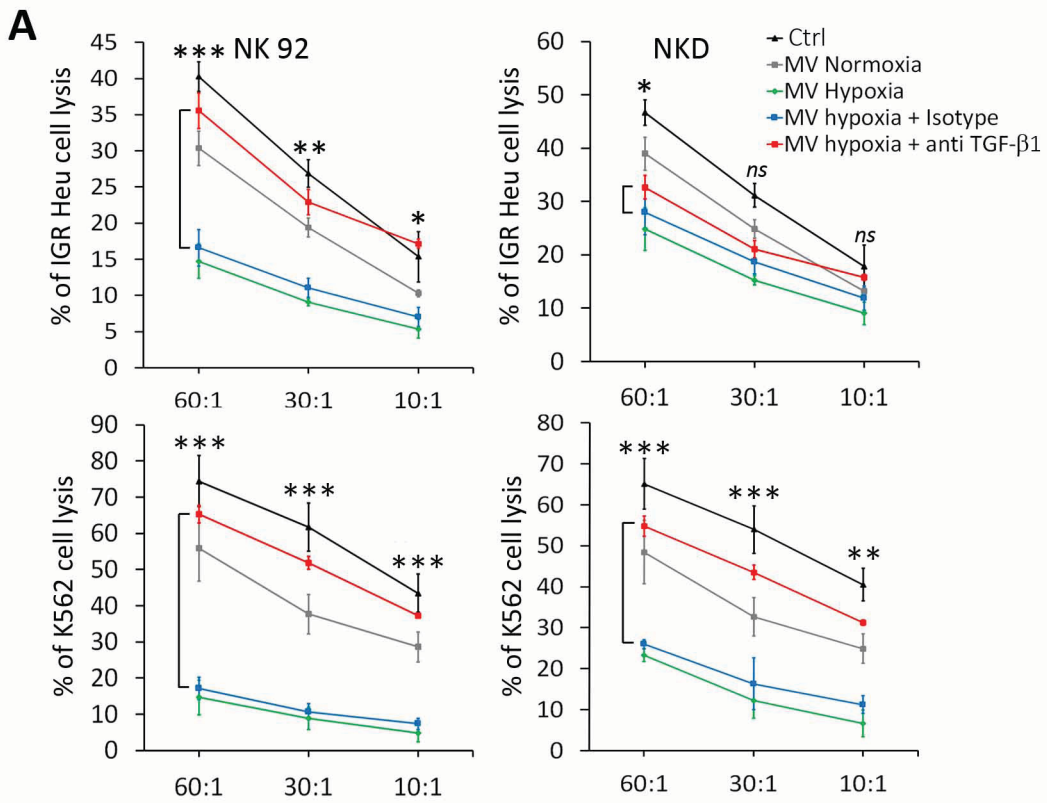
**B**



**C**



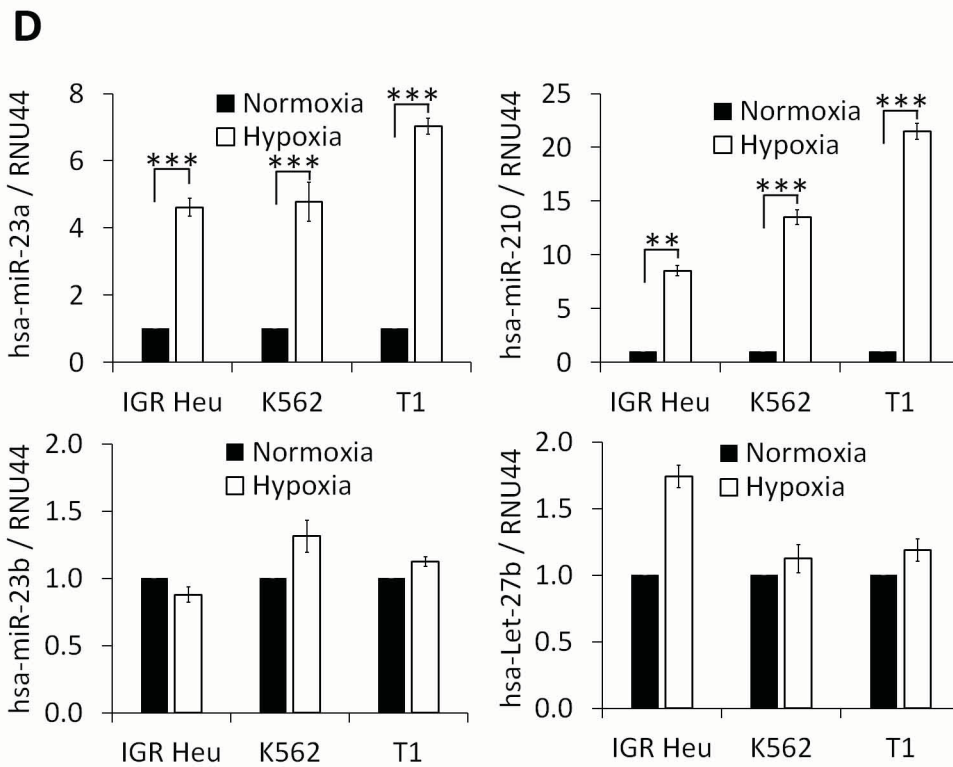
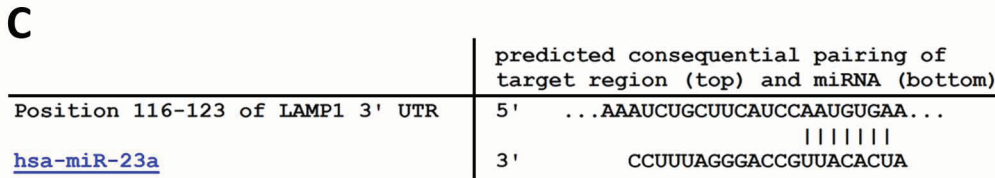
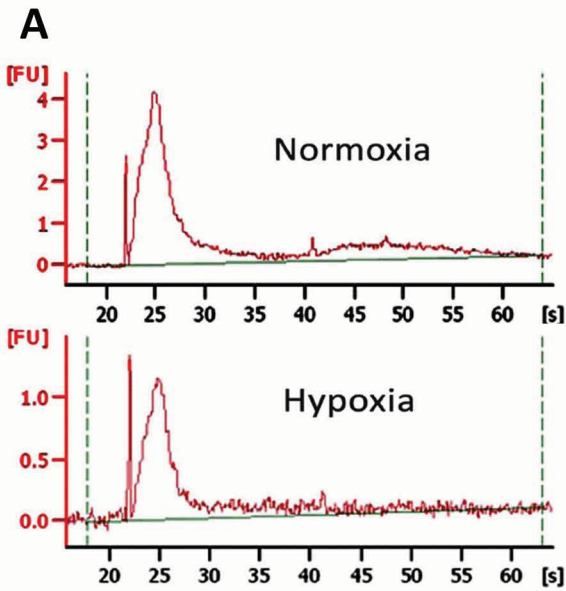
**Berchem et al., Figure 4**

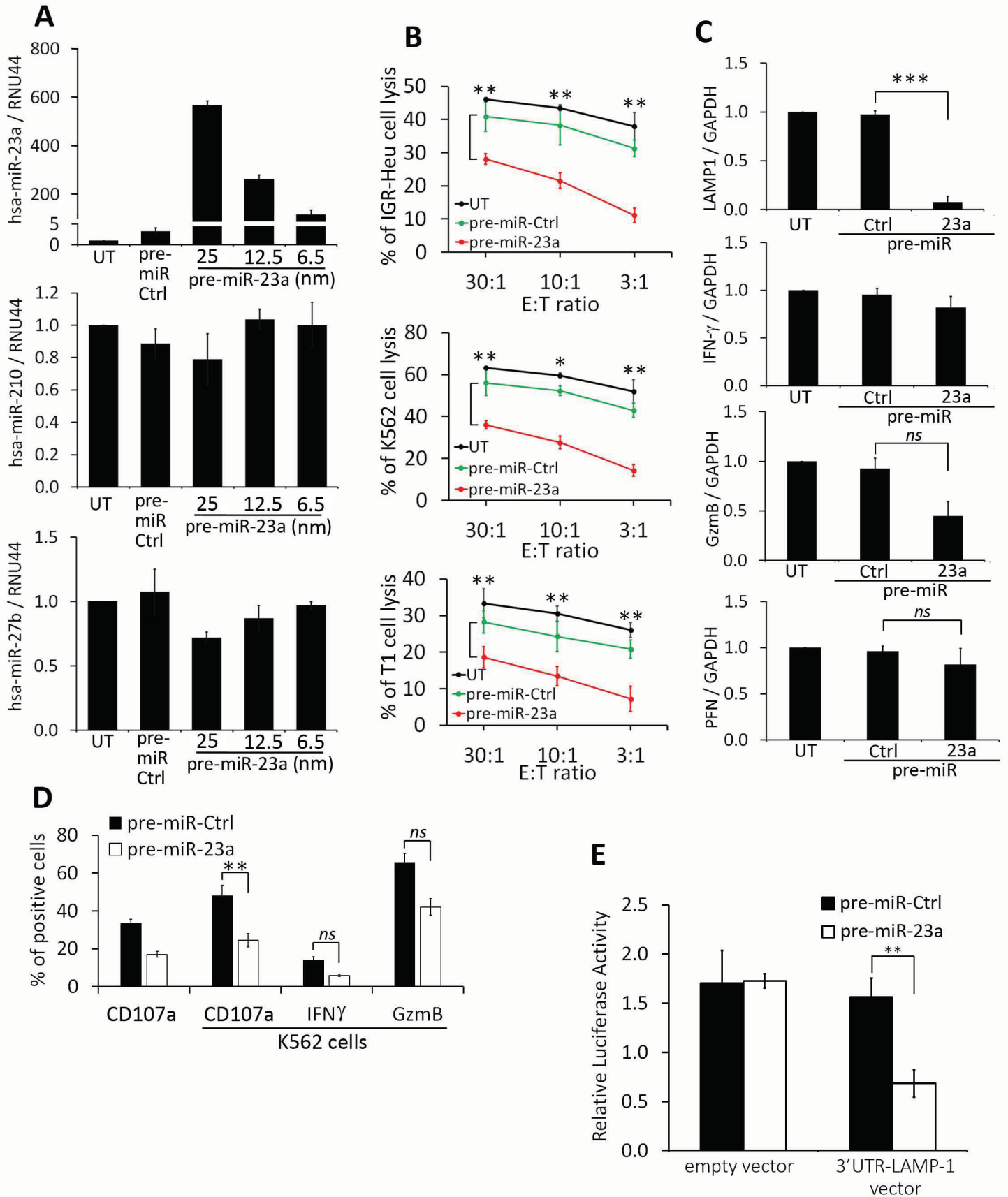


Berchem et al., Figure 5

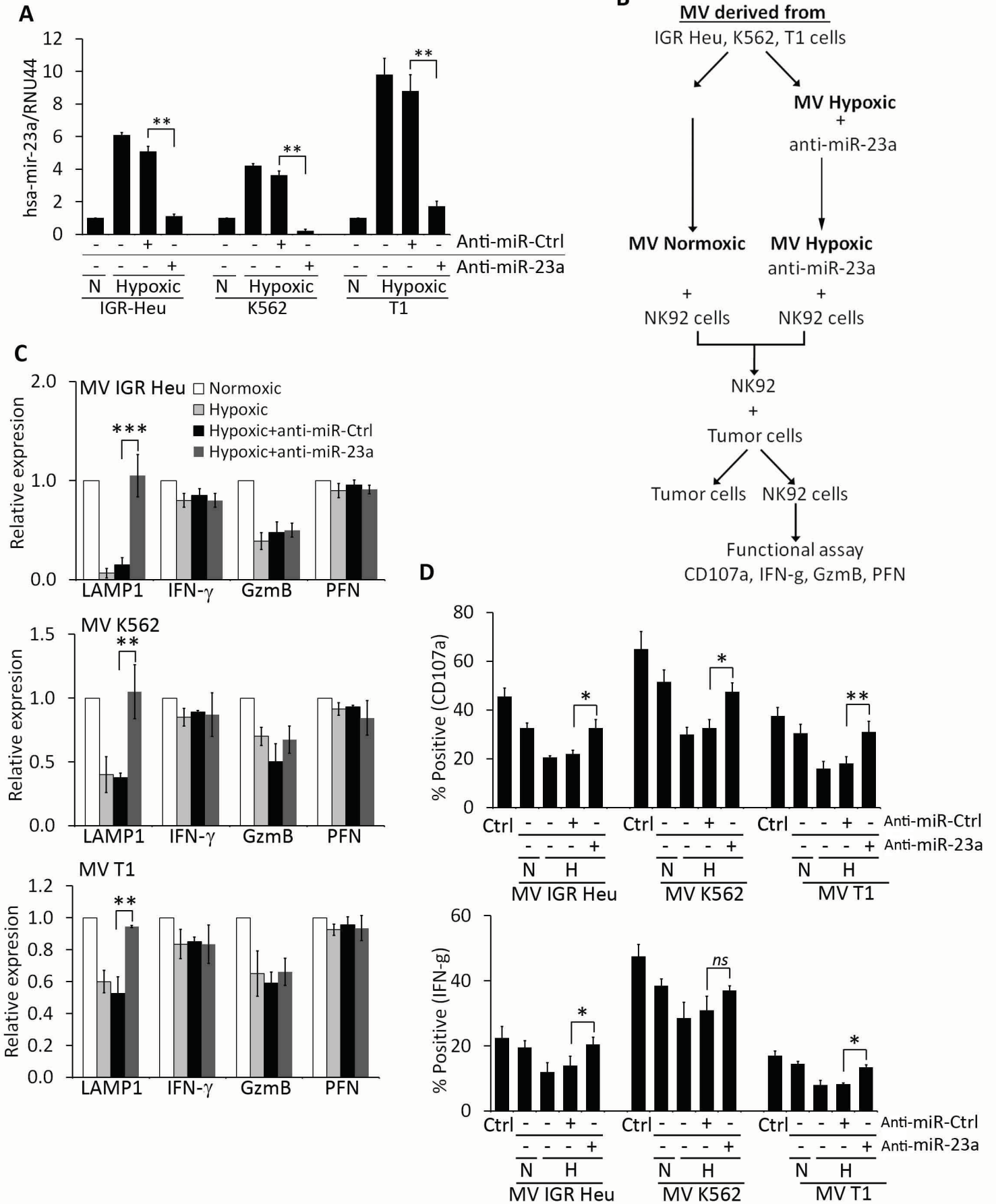
**B**

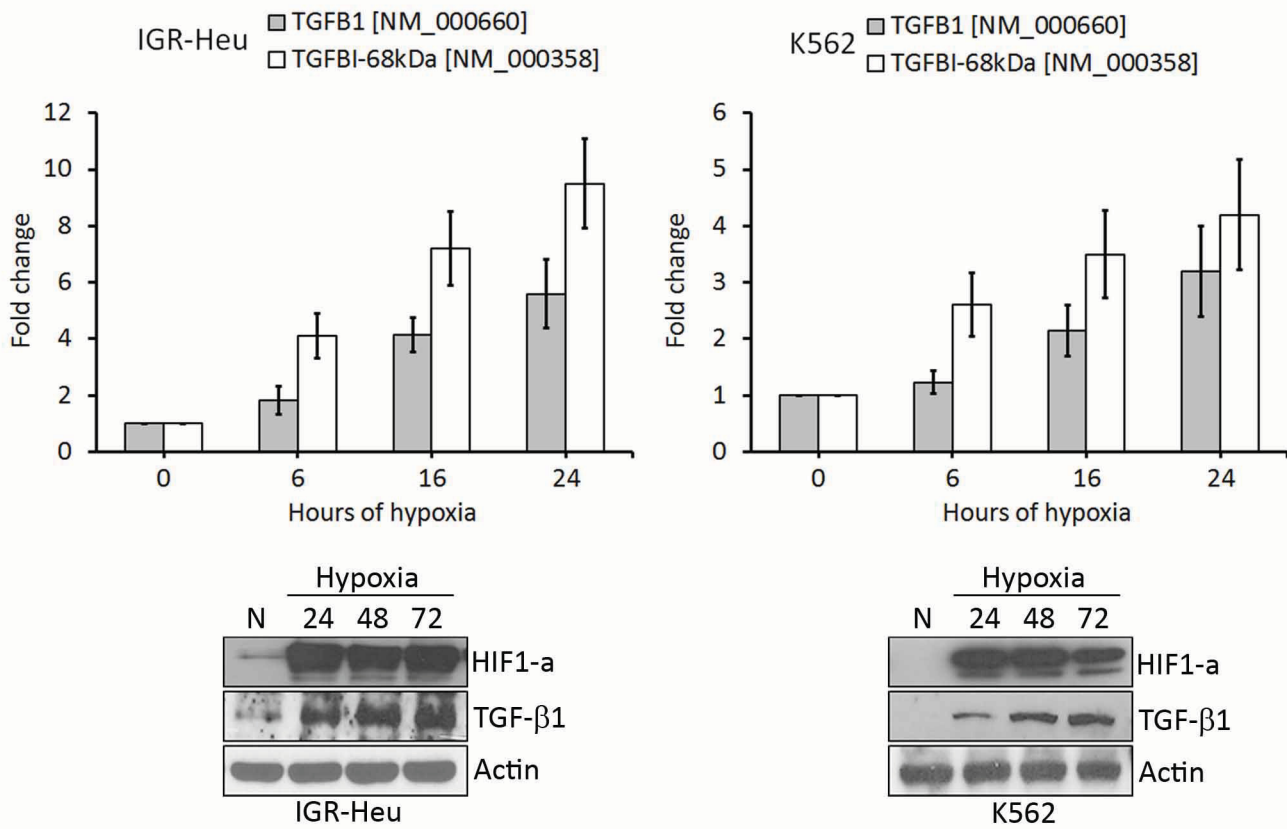
	Fold change
hsa-miR939	2.67
hsa-miR129#	2.75
hsa-miR489	2.83
hsa-miR378	2.83
hsa-miR423-5p	2.92
hsa-miR29c	3.00
hsa-miR596	3.08
hsa-miR376a	3.08
hsa-miR1275	3.17
hsa-miR769-5p	3.33
hsa-miR601	3.33
hsa-miR339-5p	3.33
hsa-miR210	3.33
hsa-miR1180	3.33
hsa-miR338-5p	4.00
hsa-miR324-5p	4.08
hsa-miR505	4.67
hsa-miR23a	4.67
hsa-miR374	4.73
hsa-miR628-5p	9.67
hsa-miR-454	-5.50
hsa-miR-425-5p	-5.25
hsa-miR-191#	-4.67
hsa-miR-30b	-4.50
hsa-miR-324-3p	-4.42
hsa-miR-144#	-4.08
hsa-miR-15b	-3.92
hsa-miR-618	-3.82
hsa-Let-7a	-3.67
hsa-miR-517a	-3.67
hsa-miR-577	-3.62
hsa-miR-142-3p	-3.58
hsa-miR-10a	-3.50
hsa-miR-744	-3.50
hsa-miR-1276	-3.42
hsa-miR-190b	-3.42
hsa-miR-218	-3.33
hsa-miR-133a	-3.25
hsa-miR-18a	-3.25
hsa-miR-30a-3p	-3.17
hsa-miR-532-3p	-3.17
hsa-miR-548c-5p	-3.17
hsa-miR-576-3p	-3.17
hsa-miR-106b	-3.00
hsa-miR-1254	-3.00
hsa-miR-191	-3.00
hsa-miR-27a	-3.00
hsa-miR-425#	-3.00
hsa-miR-642	-3.00
hsa-miR-886-3p	-3.00
hsa-miR-10b	-2.83
hsa-miR-126#	-2.83
hsa-miR-1290	-2.83
hsa-miR-16-1#	-2.83
hsa-miR-27b	-2.83
hsa-miR-301b	-2.83
hsa-miR-409-3p	-2.80
hsa-miR-1227	-2.75
hsa-miR-1285	-2.75
hsa-miR-128a	-2.72
hsa-miR-183#	-2.67
hsa-miR-192	-2.67
hsa-miR-572	-2.50





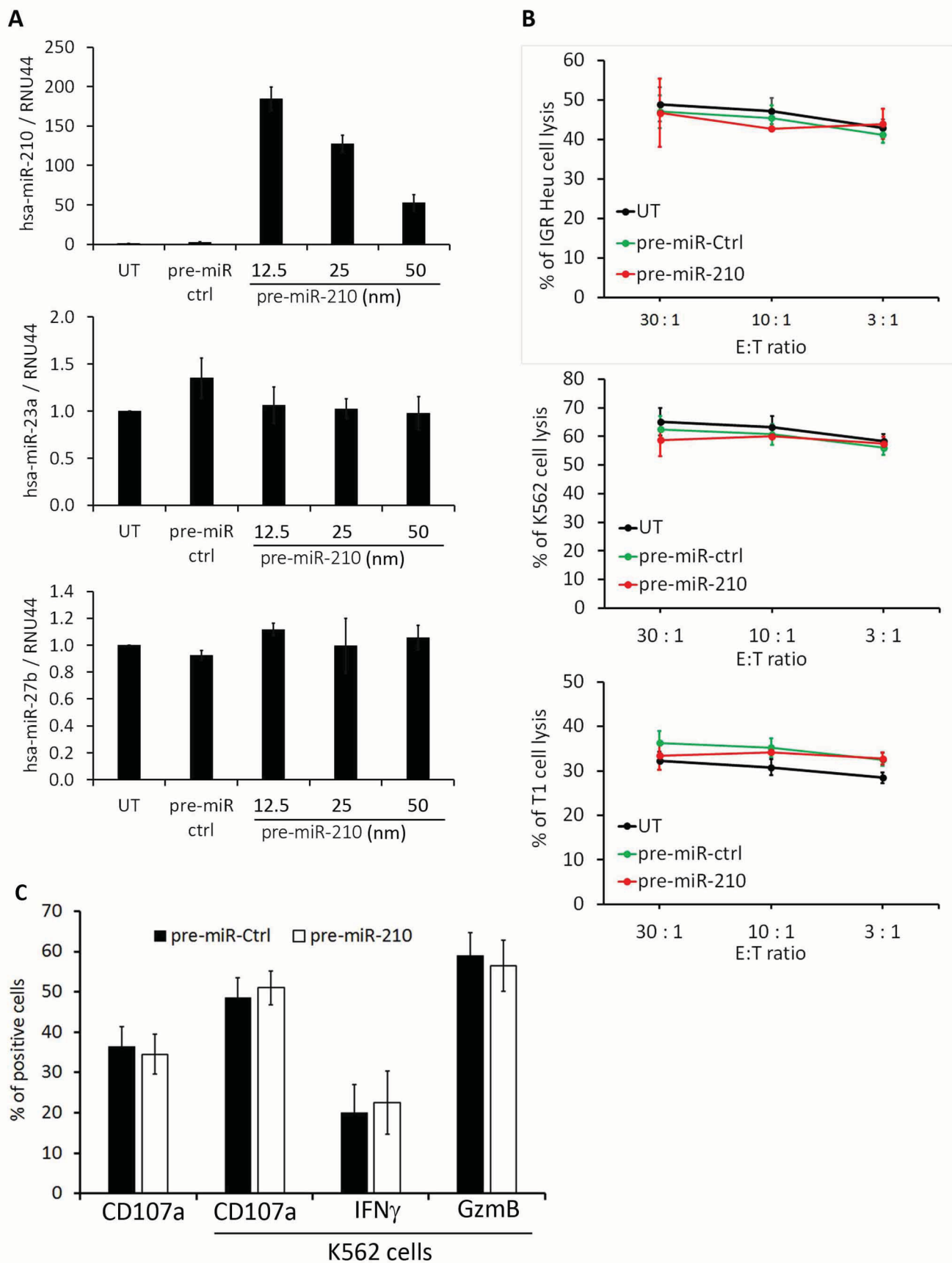






**Supplementary Figure 1**

The effect of hypoxia on the expression of TGF-β1 in IGR-Heu and K562 cells. Cells were cultured at different time points under hypoxia and the expression of both isoforms of TGF-β1 (NM\_000660 and NM\_000358) was assessed at the mRNA (upper panels) and protein (lower panels) level in IGR-Heu (left panels) and K562 (right panels) cells.

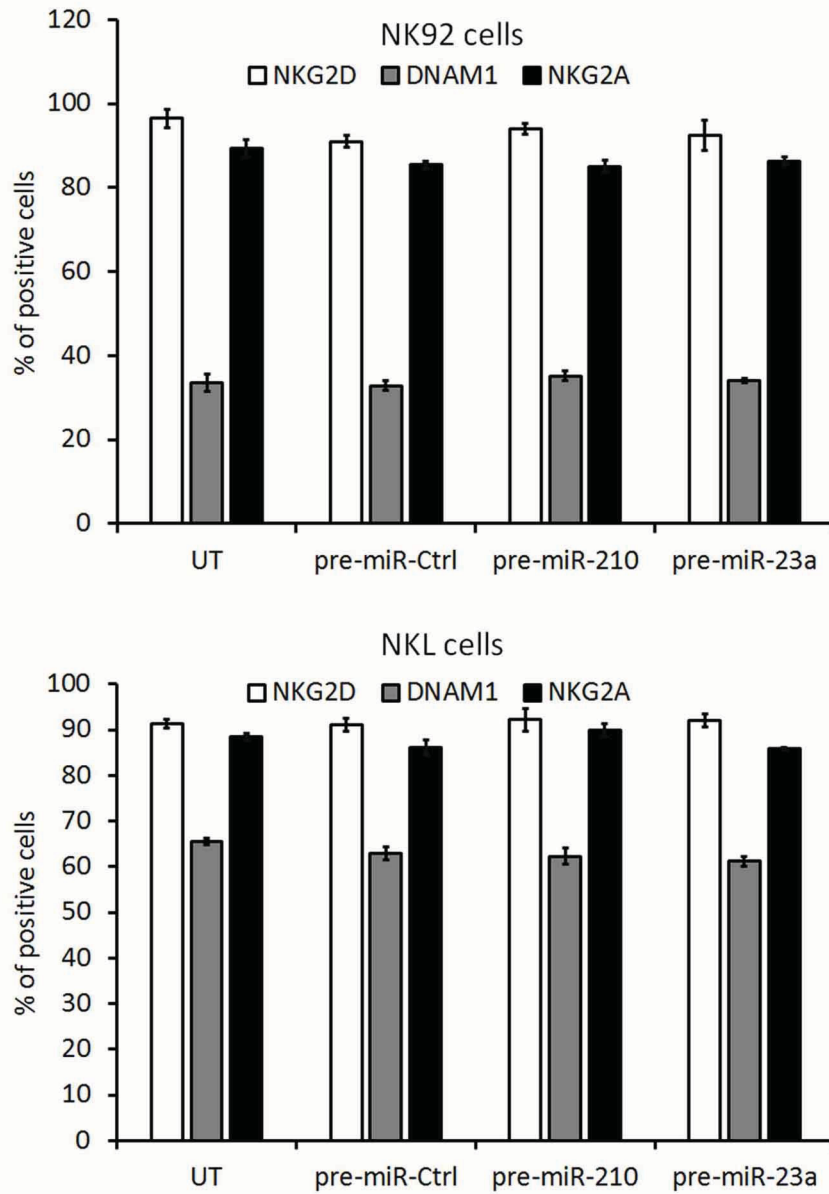


## Supplementary Figure 2

**A)** The effect of pre-miR-210 transfection on the expression of miR-23a in natural killer (NK) cells. NK-92 cells were untransfected (UT) or transfected with pre-miR control (pre-miR-Ctrl) or different concentrations of pre-miR-210. Cells were subjected to real time PCR analysis for the expression of miR-210 (upper panel); miR-23a (middle panel) and miR-27b (lower panel) used as control.

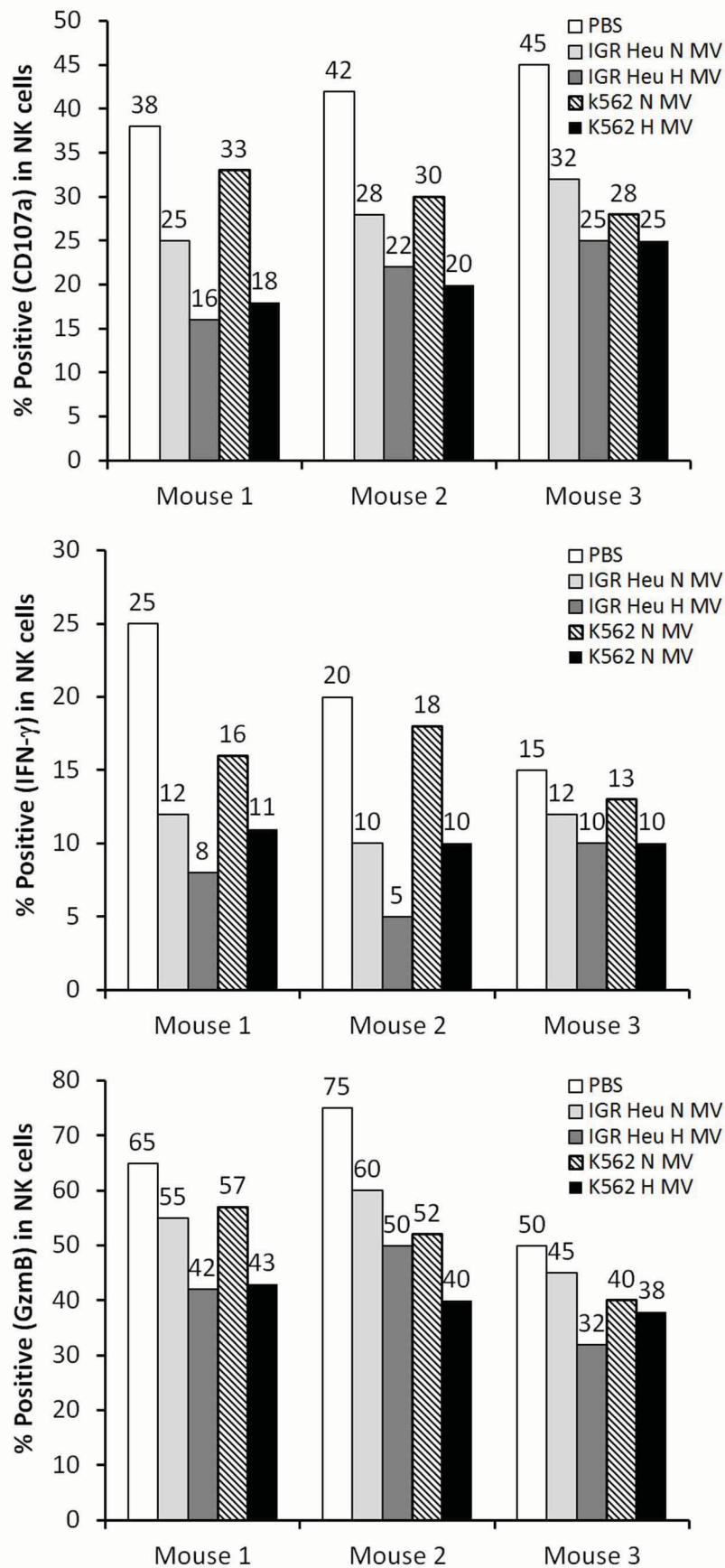
**B)** Cytotoxicity of NK-92 cells expressing pre-miR-210. NK-92 cells transfected as described in A were co-cultured with IGR-Heu (upper panel); K562 (middle panel) or T1 (lower panel) and the percentage of tumor cells lysed was assessed at different effector:target ratios (30:1, 10:1 or 3:1) as described in Figure 2A.

**C)** The expression of CD107a, IFN-g, and GzmB in NK-92 cells transfected pre-miR-Ctrl or pre-miR-210 and cultured alone or in the presence of K562 target cells.



**Supplementary Figure 3**

The expression of NKG2D, DNAM1, and NKG2A at the surface of natural killer (NK)-92 (upper panel) and NKL (lower panel) cells, untransfected (UT) or transfected with either pre-miR-Ctrl, pre-miR-210 or pre-miR23a.



#### Supplementary Figure 4

The effect of tumor cell-derived microvesicles (MVs) on the function of natural killer (NK) cells in vivo. Mice were injected intradermally every day for 7 days with phosphate buffered saline (PBS) or with 50  $\mu$ g of MVs in PBS. NK cells were sorted from draining lymph nodes by cd49b antibody coated beads and co-cultured with Renca cells. After separation from their target, the expression of CD107a, IFN- $\gamma$ , and GzmB was assessed by FACS analysis.

**2. Article 2: Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia.**

Baginska J, Viry E\*, **Berchem G\***, Poli A, Noman MZ, van Moer K, Medves S, Zimmer J, Oudin A, Niclou SP, Bleackley RC, Goping IS, Chouaib S, Janji B.

\* Equal contribution

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**

**2013**, 110(43): 17450-17455.

## Résumé de l'article 2

**Le stress hypoxique réduit la sensibilité des cellules tumorales à la lyse par les cellules NK en condition d'hypoxie par l'induction de l'autophagie qui dégrade le Granzyme B dans la cellule tumorale.**

L'hypoxie est de plus en plus clairement reconnue comme inducteur d'une immunosuppression tumorale (Lee et al., 2010a), et nous avons précédemment montré que en situation d'hypoxie tumorale, la lyse cellulaire médiée par les CTL est inhibée selon un mécanisme impliquant STAT3 (Noman et al., 2011). Les cellules tumorales en situation d'hypoxie ont tendance à réagir entre autre en activant un mécanisme d'autophagie, qui de part la dégradation et le recyclage de protéines et d'organelles, produit l'énergie nécessaire pour leur survie.

Un autre rôle de l'autophagie a récemment été reconnu, il s'agit de son implication dans l'immunoévasion tumorale, mais aucun lien mécanistique direct n'avait jusqu'à présent été mis en évidence pour expliquer la régulation de la réponse immunitaire NK par l'autophagie en conditions d'hypoxie.

Dans cette étude nous montrons que l'autophagie est un acteur majeur dans la résistance des cellules tumorales de cancer du sein à la cytolysse par les NKs. En effet des cellules MCF7 et T47D cultivées en hypoxie ( $pO_2$  : 0.1%) sont très modestement lysées par cellules NK tandis que les cellules cultivées en normoxie sont bien lysées. Par ailleurs on montre que cette inhibition de la cytolysse corrèle avec une induction du phénomène d'autophagie dans les cellules tumorales cultivées en hypoxie comparées à celles en normoxie. Par ailleurs l'autophagie induite par manque de nutriments donne clairement les mêmes résultats.

Afin de déterminer l'étendue de la relation causale entre l'induction d'autophagie et l'inhibition de la lyse NK nous avons utilisé des cellules tumorales autophagie déficientes (+/- Beclin 1 sous le contrôle d'un promoteur tet on/off). Il est montré que en situation d'hypoxie, les cellules autophagie déficientes (Becline-) sont mieux lysées par les NK que les cellules autophagie compétentes (Becline +). On peut donc conclure que l'autophagie est un déterminant majeur dans l'inhibition de la cytolyse NK en condition d'hypoxie.

Nous avons alors montré que cette inhibition de la lyse NK en situation d'hypoxie n'était pas liée à un défaut de la reconnaissance tumorale par les NK en vérifiant si les tumeurs en hypoxie ne surexprimaient pas des molécules NK inhibitrices comme le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou au contraire avaient une expression diminuée de ligands pour le récepteur activateur des NK le NKG2D. Bien que nous avons pu montrer en effet une augmentation significative de HLA A, B et C sur les cellules tumorales MCF7 autophagie compétentes (Beclin +) en hypoxie et non sur les autophagie incompétentes (Beclin -), un blocage des antigènes HLA de classe I par des anticorps ne change pas la diminution de la cytotoxicité NK en hypoxie observée dans les cellules autophagie compétentes.

Des expériences en microscopie confocale ont montré que il existait autant de contacts étroits entre les NK et les cellules tumorales que ces dernières soient autophagie compétentes ou incompétentes ou en hypoxie ou normoxie. En ce qui concerne les ligands activateurs de NKG2D comme MICA, MICB ou ULBP-1 ils sont exprimés de façon constante sur les cellules tumorales autophagie compétentes ou incompétentes ou en hypoxie ou normoxie. La dégranulation des NKs a aussi pu être mise hors de cause comme responsable de la différence de cytotoxicité, comme le CD107a (un marqueur de



dégranulation) augmente de façon équivalente que la cellule soit en contact avec des cellules tumorales normoxiques ou hypoxiques.

Nous avons par contre pu montrer que le Granzyme B incorporé dans les cellules tumorales et provenant de la cellule NK est dégradé par un mécanisme autophagie dépendant et est donc nettement plus dégradé dans les cellules autophagie compétentes (Beclin +) et non (Beclin -) en hypoxie, ce qui semble expliquer le phénomène observé.

On peut donc déduire que le Granzyme B relargué par les NKs est incorporé par la cellule tumorale en autophagie et que ce Granzyme B est alors absorbé dans des granules autophagiques et dégradé par les lysosomes. Ceci est corroboré par le fait que le niveau de Granzyme B au niveau de la cellule tumorale remonte après traitement par des inhibiteurs des hydrolases lysosomales comme la chloroquine, et la pepstatine. Par ailleurs, le niveau de perforine n'est pas altéré dans aucune des conditions testées.

Afin d'élucider ce mécanisme plus en détail, nous nous sommes alors intéressés à la distribution subcellulaire du Granzyme B par des expériences de fractionnement de cellules autophagie compétentes et incompétentes. Une différence importante a été notée entre les fractions positives pour le Granzyme B entre les cellules autophagie compétentes hypoxiques et normoxiques, et qui plus est les fractions hypoxiques contenant du Granzyme B contiennent aussi du LC3 signature bien connue des autophagosomes. Ceci est confirmé par des expériences en immunofluorescence montrant une colocalisation de Granzyme B et de LC3 dans les mêmes structures subcellulaires. Par ailleurs, la sélectivité de cette incorporation du Granzyme B dans les autophagosomes est indiquée par le fait que l'inhibition de la protéine cargo p62 en

hypoxie restaure le profil observé en normoxie, indiquant que ce transfert de Granzyme B est bien sélectif.

Finalement des expériences de xénogreffes sur souris BALB/c déplétées NK in vivo dans deux modèles (mélanome B16-F10 et sein 4T1), produisant tous les deux des tumeurs hautement hypoxiques ont été conduites. Pour cela les cellules tumorales B16-F10 et 4T1 ont été transfectées avec un shRNA lentiviral BECN1- ou un shRNA contrôle. Cette expérience démontre que chez des souris NK +, transfectées avec des cellules tumorales autophagie compétentes (shRNA contrôle) ont des tumeurs beaucoup plus grandes que celles transfectées avec des cellules autophagie incompetentes (shRNA BECN1-). Cette différence n'est plus observée chez des souris déplétées en NK.

En résumé on peut donc dire que le blocage de l'autophagie tumorale facilite la lyse par les cellules NK par un mécanisme dépendant de la dégradation spécifique intracellulaire du Granzyme B par la machinerie autophagique sous le contrôle d'un transporteur de type p62 du cytoplasme vers l'autophagosome.

Ce mécanisme constitue donc une cible potentielle dans la lutte contre l'immunoévasion NK des cellules tumorales.

# Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia

Joanna Baginska<sup>a</sup>, Elodie Viry<sup>a,1</sup>, Guy Berchem<sup>a,1</sup>, Aurélie Poli<sup>b</sup>, Muhammad Zaeem Noman<sup>c</sup>, Kris van Moer<sup>a</sup>, Sandrine Medves<sup>a</sup>, Jacques Zimmer<sup>b</sup>, Anaïs Oudin<sup>d</sup>, Simone P. Niclou<sup>d</sup>, R. Chris Bleackley<sup>e</sup>, Ing Swie Goping<sup>e</sup>, Salem Chouaib<sup>c,2</sup>, and Bassam Janji<sup>a,2,3</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Experimental Hemato-Oncology, Department of Oncology, and <sup>b</sup>Laboratory of Immunogenetics and Allergology, Public Research Center for Health, L-1526 Luxembourg City, Luxembourg; <sup>c</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unit 753, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, F-94805 Villejuif Cedex, France; <sup>d</sup>NorLux, Neuro-Oncology Laboratory, Department of Oncology, Public Research Center for Health, L-1526 Luxembourg City, Luxembourg; and <sup>e</sup>Department of Biochemistry, University of Alberta, T6G 2H7 Edmonton, AB, Canada

Edited by Noboru Mizushima, Graduate School and Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, and accepted by the Editorial Board September 1, 2013 (received for review March 18, 2013)

Recent studies demonstrated that autophagy is an important regulator of innate immune response. However, the mechanism by which autophagy regulates natural killer (NK) cell-mediated antitumor immune responses remains elusive. Here, we demonstrate that hypoxia impairs breast cancer cell susceptibility to NK-mediated lysis *in vitro* via the activation of autophagy. This impairment was not related to a defect in target cell recognition by NK cells but to the degradation of NK-derived granzyme B in autophagosomes of hypoxic cells. Inhibition of autophagy by targeting beclin1 (BECN1) restored granzyme B levels in hypoxic cells *in vitro* and induced tumor regression *in vivo* by facilitating NK-mediated tumor cell killing. Together, our data highlight autophagy as a mechanism underlying the resistance of hypoxic tumor cells to NK-mediated lysis. The work presented here provides a cutting-edge advance in our understanding of the mechanism by which hypoxia-induced autophagy impairs NK-mediated lysis *in vitro* and paves the way for the formulation of more effective NK cell-based antitumor therapies.

hypoxic tumor microenvironment | innate immunity | breast adenocarcinoma | immunotherapy

The major obstacle to defining an efficient immunotherapy protocol for the treatment of solid tumors is the capacity of the tumor microenvironment (TME) to inhibit the host immune response at both the local and systemic levels (1). The TME is a complex, dynamic structure composed of malignant cells and cells that influence cancer evolution, such as endothelial and immune cells (2). The TME is an important aspect of cancer biology, as it can promote neoplastic transformation, support tumor growth and invasion, protect tumors from host immunity, foster therapeutic resistance, and provide niches for dormant metastases (3). Natural killer (NK) cells are large, granular CD3<sup>-</sup>/T-cell receptor<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> lymphocytes that play a fundamental role in antitumor innate immunity (4) and participate in tumor immunosurveillance. They can kill tumor cells directly via the engagement of death receptors [Fas and TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand)] and the release of perforin- and granzyme-containing granules; or indirectly via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (5, 6). The role of NK cells in tumor regression was investigated by several studies showing that tumor infiltration by NK cells predicts a favorable outcome for several cancers (7–10). The activity of NK cells is regulated by the expression of activating and inhibitory receptors that together dictate the fate of target tumor cells. The function of NK cells is inhibited by the interaction between HLA class I molecules, expressed on the surface of target cells, and killer cell Ig-like receptors (KIR) and/or CD94/NKG2A, expressed on the surface of NK cells (11). The activation of NK cells is mediated by NKp46, NKp30, and NKp44, as well as CD226 and NKG2D.

The up-regulation of stress-inducible proteins on the surface of cancer cells, such as MHC class I-related chain (MIC) A and B ligands and UL16-binding proteins (ULBPs), leads to the activation of NK cells through the engagement of NKG2D (12). The loss of HLA class I expression and the up-regulation of MICA/B and ULBP1 is a common characteristic of tumors (13), which makes them targets for NK-mediated lysis (14).

Accumulating data suggest that a hypoxic microenvironment protects cancer cells from the antitumor immune response by multiple overlapping mechanisms (reviewed in ref. 15). We recently reported that under hypoxic conditions, tumor cells resist antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL)-mediated lysis in a signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-dependent manner (16). Hypoxia also contributes to the reprogramming of dendritic cells (DCs) and perpetuates inflammation via the induction of a proinflammatory DC phenotype (17). Under hypoxia, tumor cells release a number of chemokines, such as endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP-II) (18), vascular endothelial growth factor (VEGF) (19), endothelin 2 (20), and monocyte chemotactic

## Significance

Natural killer (NK) cells are effectors of the antitumor immunity, able to kill cancer cells through the release of the cytotoxic protease granzyme B. NK-based therapies have recently emerged as promising anticancer strategies. It is well established that hypoxic microenvironment interferes with the function of antitumor immune cells and constitutes a major obstacle for cancer immunotherapies. We showed that breast cancer cells evade effective NK-mediated killing under hypoxia by activating autophagy that we have identified to be responsible for the degradation of NK-derived granzyme B. We demonstrated that blocking autophagy restored NK-mediated lysis *in vitro*, and facilitated breast tumor elimination by NK cells *in mice*. We provided evidence that targeting autophagy may pave the way to achieve more effective NK-based anticancer immunotherapy.

Author contributions: J.B., E.V., and B.J. designed research; J.B., E.V., G.B., A.P., M.Z.N., K.v.M., S.M., and A.O. performed research; R.C.B. and I.S.G. contributed new reagents/analytic tools; J.B., E.V., G.B., A.P., M.Z.N., K.v.M., S.M., J.Z., S.P.N., S.C., and B.J. analyzed data; and J.B., E.V., and B.J. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

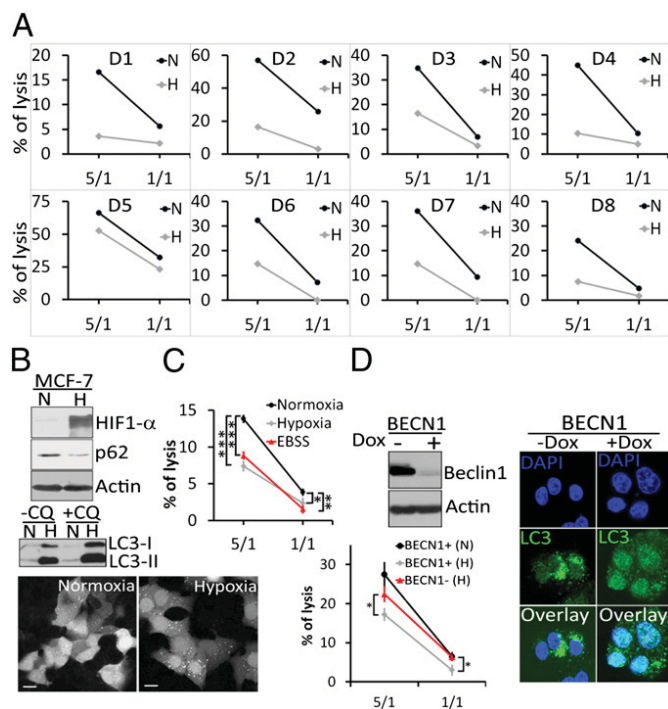
This article is a PNAS Direct Submission. N.M. is a guest editor invited by the Editorial Board.

<sup>1</sup>E.V. and G.B. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>S.C. and B.J. were co-principal investigators.

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: bassam.janji@crp-sante.lu.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1304790110/-/DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1304790110/-/DCSupplemental).



**Fig. 1.** Hypoxia-induced autophagy decreases the susceptibility of breast cancer cells to NK-mediated lysis in vitro. (A) Cytotoxicity assays were performed in duplicate using NK cells isolated from eight healthy donors (D1 to D8) at 5/1 or 1/1 E/T (Effector/Target) ratios on normoxic (N) or hypoxic (H) MCF-7 cells. Cell death was assessed by flow cytometry using TO-PRO-3. (B, Upper) Cells were cultured under normoxia (N) or hypoxia (H) conditions for 16 h. The expression levels of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , p62, and LC3 were assessed by immunoblot. (B, Middle) Untreated (–CQ) or chloroquine (60  $\mu$ M) treated (+CQ) cells cultured under normoxia (N) or hypoxia (H) were assessed by immunoblot for the expression of LC3. (B, Lower) GFP-LC3 expressing normoxic or hypoxic MCF-7 cells were analyzed by fluorescence microscopy for the autophagosome formation (dots). (Scale bar, 10  $\mu$ m.) (C) MCF-7 cells were cultured under normoxia, hypoxia, or starvation [Earle's balanced salt solution (EBSS)]. Cytotoxicity assays were performed using NK cells isolated from a healthy donor (D12). The percentage of tumor cell lysis is reported as an average ( $\pm$ SEM) of three experiments performed. Statistically significant differences are indicated by asterisks (\* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.005; \*\*\* $P$  < 0.0005). (D, Upper Left) Autophagy-competent and -defective MCF-7 cells were generated by culturing cells expressing BECN1 under the control of a tetracycline-responsive promoter (BECN1) in the absence (–) or presence (+) of doxycycline (100 ng/mL), respectively. Beclin1 expression was assessed by immunoblot. (D, Right) The formation of autophagosomes (dot-like structures) in autophagy-competent (–Dox) and autophagy-defective (+Dox) hypoxic cells was assessed using immunofluorescence microscopy with an Alexa-Fluor-488-coupled LC3 antibody. Nuclei were stained with DAPI. (Scale bar, 10  $\mu$ m.) (D, Lower Left) Cytotoxicity assays were performed on autophagy competent (BECN1+) or defective (BECN1–) MCF-7 cells cultured under normoxic (N) or hypoxic (H) conditions with NK cells isolated from a healthy donor (D13). The percentage of tumor cell lysis is reported as an average ( $\pm$ SEM) of three experiments, and statistically significant differences are indicated by asterisks (\* $P$  < 0.05).

protein-1 (MCP-1/CCL2) (21). The secretion of such cytokines leads to the accumulation of tumor-associated macrophages (TAM) and regulatory T-cells (Treg). TAM and Treg cells produce transforming growth factor- $\beta$  and suppress the proliferation and activity of NK cells (22). In addition, it has been proposed that hypoxia contributes to the escape of prostate tumor cells from NK-mediated immunosurveillance by increasing the shedding of MIC molecules (23).

It is well established that the adaptation of cancer cells to hypoxic stress can also occur through the activation of autophagy, which is a process responsible for the degradation and

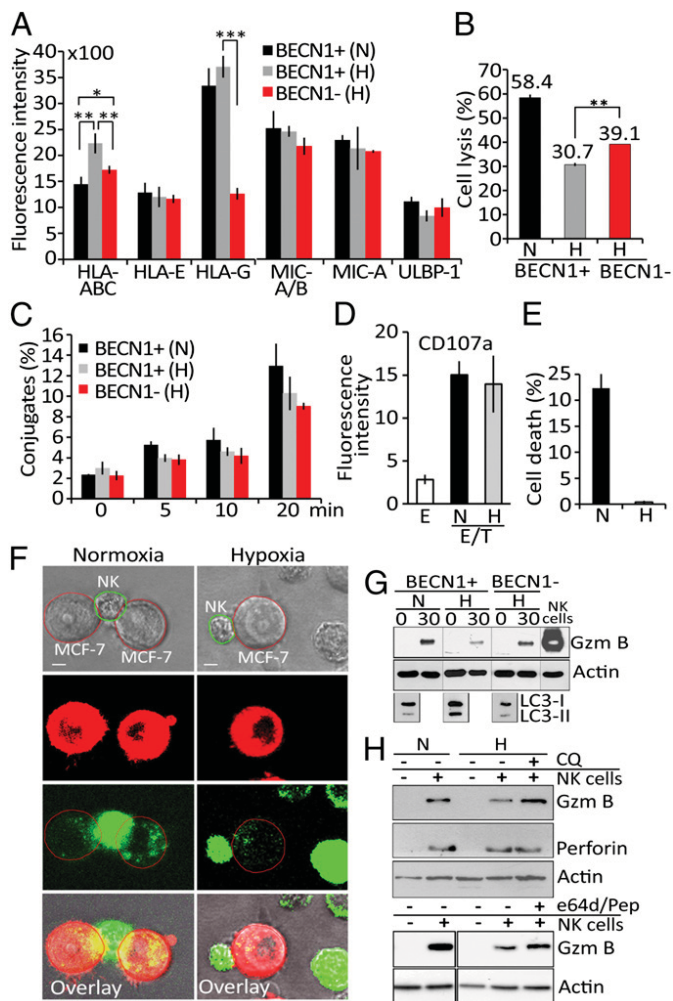
recycling of long-lived proteins and cytoplasmic organelles in well-characterized structures named autophagosomes. Recently, the role of autophagy was expanded to include immunological functions, including interactions with the immune system in the TME (16, 24, 25). Although these studies highlight autophagy as an important player in the regulation of cancer immunity, no data are currently available that address the mechanisms by which autophagy regulates NK-dependent immune responses during hypoxia.

While clinical trials using NK-based immunotherapy have shown promising results for the treatment of hematological malignancies, solid tumors are frequently resistant to this therapy. Understanding the molecular mechanisms that underlie tumor escape from NK-mediated surveillance remains an issue of major interest. In this report, we demonstrate that hypoxia reduces breast cancer cell susceptibility to NK-mediated lysis by a mechanism involving the activation of autophagy and the subsequent degradation of NK-derived granzyme B (GzmB) in vitro. We provide in vivo evidence that blocking autophagy in hypoxic tumors induces tumor regression by facilitating NK-mediated elimination. This study highlights autophagy as a unique mechanism of tumor cell resistance to NK-mediated lysis.

## Results

**Hypoxia-Induced Autophagy in Breast Cancer Cells Decreases Susceptibility to NK-Mediated Lysis.** We investigated whether hypoxia impairs NK-mediated lysis of MCF-7 breast adenocarcinoma cells. Using NK cells isolated from the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of eight healthy donors (D1 to D8), we demonstrated (Fig. 1A) that despite the interindividual variability of NK cell cytolytic potential, the percentage of hypoxic (H) MCF-7 cell lysis by NK cells was decreased compared with that of normoxic (N) MCF-7 cells in all cases.

This impairment correlated with the induction of the autophagic flux as indicated by the degradation of p62/Sequestosome 1 (SQSTM1), the accumulation of microtubule-associated protein light chain-3 II (LC3-II) in chloroquine (CQ)-treated cells and the formation of autophagosomes in hypoxic cells (Fig. 1B and Fig. S1A). Time-lapse video microscopy of GFP-LC3-expressing normoxic or hypoxic MCF-7 cells (Fig. S1B) cocultured with PKH-26-stained NK cells confirmed that normoxic tumor cells were efficiently lysed by NK cells (Movie S1) compared with hypoxic tumor cells, which displayed several autophagosomes (Movie S2). In addition, time-lapse video microscopy performed under the same conditions using propidium iodide provided compelling evidence that normoxic tumor cells underwent NK-mediated cell death (Movie S3) compared with hypoxic tumor cells (Movie S4). Similar results were obtained using the T47D breast cancer cell line (Fig. S1C), which confirms that the impairment of breast tumor cell susceptibility to NK-mediated lysis during hypoxia is not restricted to the MCF-7 cell line. In addition, we demonstrated that, independently of hypoxia, autophagy induction by other stimuli (e.g., starvation) also impairs NK-mediated lysis (Fig. 1C). To determine the extent to which the induction of autophagy is implicated in the impairment of NK-cell-mediated lysis, we used the MCF-7 cell line expressing Beclin1 (MCF-7<sup>BECN1</sup>) under the control of a tetracycline-responsive promoter (tet-off). Using this cell line, autophagy-competent (MCF-7<sup>BECN1+</sup>) or autophagy-defective (MCF-7<sup>BECN1–</sup>) MCF-7 cells can be generated by culturing cells in the absence (–) or presence (+) of doxycycline, respectively (Fig. 1D, Upper Left and Right). Cytotoxic assay (Fig. 1D, Lower Left) clearly demonstrated that NK cells kill autophagy-deficient (BECN1–) MCF-7 cells more efficiently than autophagy-competent (BECN1+) MCF-7 cells under hypoxic conditions. Similar results were obtained in ATG5-deficient MCF-7 cells (Fig. S1D). These data indicate that autophagy itself is a key determinant in the impairment of NK-mediated lysis of MCF-7 tumor cells.

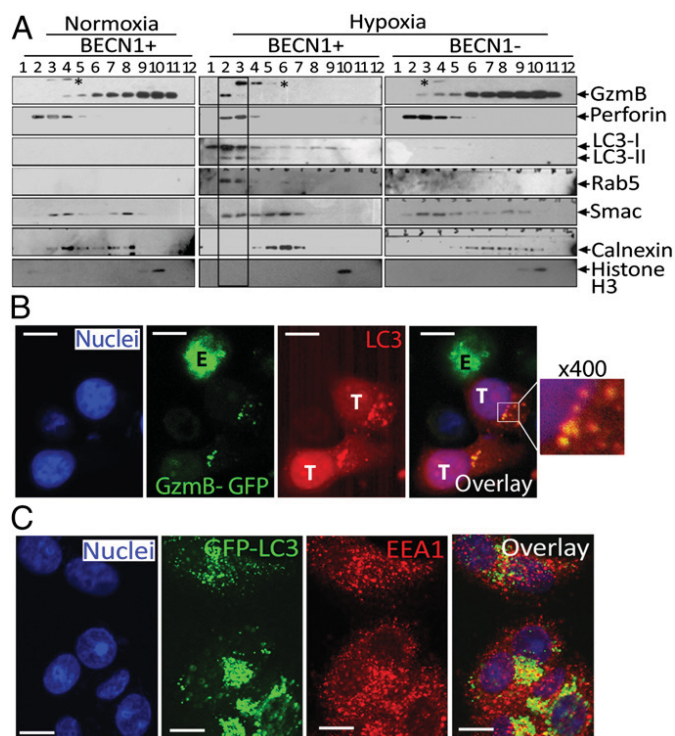


**Fig. 2.** Hypoxia-induced autophagy impairs tumor cell susceptibility to NK-mediated lysis without affecting NK cell function. (A) Autophagy-competent (BECN1+) and -defective (BECN1-) MCF-7 cells cultured under normoxia (N) or hypoxia (H) were assessed by flow cytometry for the expression of MHC class I molecules and NK cell-activating NKG2D ligands. Fluorescence intensity is reported as an average ( $\pm$ SEM) of three experiments. Statistically significant differences are indicated by asterisks (\* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.005; \*\*\* $P$  < 0.0005). (B) BECN1+ or BECN1- MCF-7 cells were pretreated with mouse IgM anti-pan HLA class I A6-136 mAb and incubated under normoxic (N) or hypoxic (H) conditions before presentation to NK cells at a 5/1 E/T ratio. The percentage of target cell lysis is reported. Statistically significant differences are indicated by asterisks (\*\* $P$  < 0.005). (C) BECN1+ or BECN1- MCF-7 cells cultured under normoxia (N) or hypoxia (H) were incubated with NK cells. The percentage of conjugate formation at indicated time was determined by flow cytometry. Results are reported as an average ( $\pm$ SEM) of three independent experiments. No statistically significant differences were observed. (D) NK cells as effectors (E) were cultured alone or with normoxic (N) or hypoxic (H) MCF-7 cells at a 5/1 E/T ratio. The level of CD107a (a degranulation marker) on the surface of the NK cells was assessed by flow cytometry. Fluorescence intensity is reported as an average ( $\pm$ SEM) of five experiments performed with NK cells from different donors. (E) Normoxic (N) or hypoxic (H) MCF-7 cells were loaded with exogenous, activated granzyme B (0.8  $\mu$ g/mL) using the pore-forming protein streptolysin-O. The percentage of cell death was determined by flow cytometry. Results are reported as an average ( $\pm$ SEM) of three experiments. (F) PKH-26-stained normoxic or hypoxic MCF-7 cells (red) were cocultured with YT-Indy-NK cells expressing GFP-GzmB (green) at 5/1 E/T ratio. The content of NK-derived GFP-GzmB in target cells was monitored after 30 min of coculture by a Zeiss laser-scanning confocal microscope (LSM-510 Meta) with a 60 $\times$  oil immersion objective. (Scale bar, 10  $\mu$ m.) (G) Autophagy-competent (BECN1+) or -defective (BECN1-) MCF-7 cells were incubated under normoxia (N) or hypoxia (H) and cocultured with NK cells at 5/1 E/T ratio for 0 and 30 min. Following separation, tumor cells were lysed and subjected to immunoblot for the intracellular GzmB content. NK cell

**Impaired NK-Mediated Lysis of Hypoxic Tumor Cells Is Not Related to a Defect in Tumor Cell Recognition by NK Cells.** We investigated whether the resistance of hypoxic tumor cells to NK-mediated lysis is related to an increase in NK-inhibitory MHC class I molecules or a decrease in NK-activating NKG2D ligands on the cell surface. Among all analyzed molecules (Fig. 2A), only HLA-A, B, and C were found to be significantly up-regulated on the surface of autophagy competent hypoxic MCF-7 cells [BECN1+ (H)] and down-regulated on autophagy-defective cells cultured under the same conditions [BECN1- (H)]. We next investigated whether the resistance of hypoxic MCF-7 cells to NK-mediated lysis was related to an increase in HLA class I molecules. Our data demonstrated that even when HLA class I molecules are blocked, the lysis of hypoxic (BECN1-) MCF-7 cells is significantly improved compared with hypoxic (BECN1+) MCF-7 cells (Fig. 2B). We therefore suggest that independently of HLA class I expression level, the autophagic status of target cells plays a key role in the resistance to NK-mediated lysis in our model. Similarly, the data presented in Fig. 2C demonstrated a time-dependent increase in the percentage of conjugates between NK and tumor cells, but no significant difference in conjugate formation was observed between autophagy-competent (BECN1+) and -defective (BECN1-) cells cultured under normoxic or hypoxic conditions. Representative images from time-lapse experiments support the conclusion that NK cells maintain their ability to interact with hypoxic cells in our model (Fig. S2). We also addressed whether the degranulation activity of NK cells was affected by hypoxic tumor cells. Fig. 2D showed a basal level of CD107a on the surface of NK cells cultured alone (E), but a significantly higher level was detected when NK cells were cocultured with normoxic or hypoxic tumor cells (E/T). As no difference in the level of CD107a was observed when NK cells were cocultured with normoxic and hypoxic tumor cells, the resistance of hypoxic tumor cells to NK-mediated lysis does not appear to be related to a defect in NK activity. Our results further suggest that resistance is dependent on an intrinsic mechanism that makes tumor cells less sensitive to the cytotoxic granules released by NK cells. This hypothesis was supported by data (Fig. 2E) demonstrating that under conditions where normoxic and hypoxic tumor cells were treated with the pore-forming protein streptolysin-O, GzmB only killed normoxic cells.

**In Vitro Hypoxic Tumor Cells Degrade NK Cell-Derived Granzyme B in Lysosomes via Autophagy.** To investigate the mechanism underlying the observed reduction of GzmB-mediated killing of H cells, we analyzed the intracellular GzmB content of target cells. PKH-26-stained normoxic or hypoxic MCF-7 cells were cocultured with YT-Indy-NK cells expressing GFP-GzmB. Significantly lower levels of GFP-GzmB were detected in hypoxic cells than in normoxic (N) cells (Fig. 2F). We next evaluated whether targeting autophagy by knocking down BECN1 restores GzmB level in hypoxic cells. Our results demonstrated that the level of GzmB is restored in BECN1-defective cells (Fig. 2G). As the NK-mediated lysis of hypoxic cells was also restored by targeting ATG5, it remains to be determined whether the level of GzmB was affected in ATG5-defective cells. Nevertheless, these results suggest that following its delivery to hypoxic cells, GzmB is loaded into autophagosomes and subsequently degraded in lysosomes. This was further supported by our data (Fig. 2H) showing that the level of GzmB was restored by autophagy and lysosomal hydrolases inhibitors chloroquine and e64d/Pepstatin,

lysate was used as a control for GzmB detection. The expression of LC3 was reported as a marker for autophagy. (H) Normoxic (N) or hypoxic (H) MCF-7 cells were cultured alone (-) or with NK cells (+) at 5/1 ratio for 30 min in the presence (+) or absence (-) of chloroquine (CQ) or e64d/pepstatin. Tumor cells separated from NK were subjected to immunoblot analysis to evaluate the intracellular GzmB and perforin content.

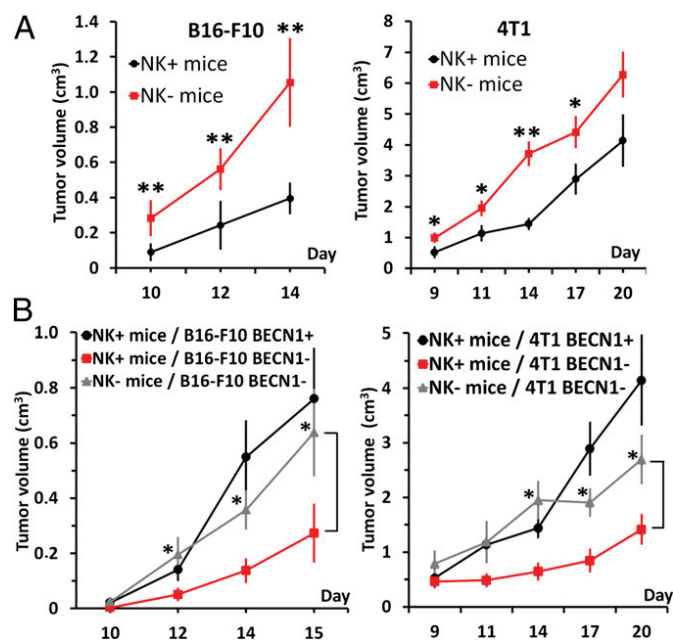


**Fig. 3.** In vitro tumor cells degrade NK cell-derived granzyme B in lysosomes via autophagy. (A) NK cells were cocultured with autophagy-competent (BECN1+) or -defective (BECN1-) normoxic or hypoxic MCF-7 cells. Cell lysates of separated tumor cells were subjected to subcellular fractionation. Fractions 1 to 12 were characterized by Western blot using the indicated antibodies. \* indicates an unspecific band. (B) Chloroquine-treated hypoxic MCF-7 cells (T) were cocultured with GzmB-GFP-expressing NK cells (E). Target cells were stained with an Alexa-Fluor-568-coupled rabbit anti-LC3 antibody to visualize autophagosomes (red) and with DAPI to stain nuclei (blue). Colocalization of GzmB with LC3 in autophagosomes was visualized by confocal microscopy using a 100 $\times$  oil immersion objective. An enlarged image (400 $\times$ ) of the overlay (box) is shown. (Scale bar, 10  $\mu$ m.) (C) Chloroquine treated GFP-LC3-expressing MCF-7 cell were cultured under hypoxia stained with anti-EEA1 Alexa-Fluor-568-coupled anti-rabbit IgG antibody (red) and DAPI for nuclei. Cells were analyzed by confocal microscopy. The overlay image shows colocalization of LC3 and EEA1 (yellow dots). (Scale bar, 10  $\mu$ m.)

respectively. In contrast, the level of perforin in target cells was not affected by hypoxia or autophagy inhibition (Fig. 2H). The subcellular distribution of NK-derived GzmB was further analyzed by fractionation of autophagy-competent (BECN1+) or -defective (BECN1-) MCF-7 cells cultured under normoxic or hypoxic conditions. Fig. 3A showed a dramatic difference in the distribution pattern of GzmB between normoxic and hypoxic (BECN1+) cells. GzmB is mostly present in fractions 4 to 11 in normoxic cells; however, it is exclusively detected in fraction 2 and to a lesser extent in fraction 3 in hypoxic cells. Interestingly, the GzmB-containing fractions 2 and 3 are positive for LC3 (autophagosomes) and Rab5 (endosomes), suggesting that these fractions may correspond to amphisomes (structures generated from the fusion of autophagosomes and late endosomes). Taken together, these results suggest that endosomes containing GzmB and perforin fuse with autophagosomes upon activation of autophagy in hypoxic cells, leading to the specific degradation of GzmB. The selectivity of GzmB degradation by autophagy was further supported by our data demonstrating that inhibition of the autophagy cargo protein p62 restores GzmB level in hypoxic targets (Fig. S3). Importantly, targeting autophagy in hypoxic cells dramatically changes the subcellular distribution of GzmB to a profile similar to that observed in normoxic cells. The presence of NK-derived GzmB in

autophagosomes of hypoxic cells was further confirmed by immunofluorescence data showing colocalization of GzmB-GFP with autophagosomes (LC3-stained structures) (Fig. 3B); those autophagosomes also contained the endosomal marker EEA1 (Fig. 3C).

**Targeting Autophagy Increased NK-Mediated Tumor Regression in Vivo.** To assess whether inhibition of autophagy improves NK-mediated tumor regression in vivo, we used two aggressive syngeneic murine models: B16-F10 melanoma tumors and 4T1 breast carcinoma tumors. B16-F10 tumors have been previously reported as highly hypoxic, with a selective activation of autophagy in hypoxic zones (16), and 4T1 tumors have been reported as a suitable experimental animal model for human mammary cancer (26). We first evaluated whether host NK cells affect B16-F10 and 4T1 tumor growth in C57BL/6 and BALB/c mice, respectively. To address this issue, control (NK+) and NK-depleted (NK-) mice, which were generated by repeated injection of normal rabbit IgG and anti-sialo GM1, respectively, were engrafted with B16-F10 or 4T1 cells. The efficiency and selectivity of anti-sialo GM1 in depleting murine NK cells in C57BL/6 and BALB/c mice are shown in Fig. S4A. The data presented in Fig. 4A demonstrated a significant increase in B16-F10 and 4T1 tumor volume in NK- mice compared with NK+ mice, indicating that NK cells play a role in B16-F10 and 4T1 tumor regression in vivo. To determine the impact of autophagy on NK-mediated lysis in vivo, we analyzed the growth of autophagy-defective (BECN1-) B16-F10 and 4T1 tumor cells in both NK+ and NK- mice. B16-F10<sub>BECN1-</sub> and 4T1<sub>BECN1-</sub> cells were generated using BECN1 shRNA lentiviral particles. B16-F10 and 4T1 cells infected with scrambled shRNA-expressing vectors (B16-F10<sub>BECN1+</sub> and 4T1<sub>BECN1+</sub>) were



**Fig. 4.** Targeting autophagy in vivo improves tumor elimination by NK cells. (A) Control (NK+) and NK-depleted (NK-) C57BL/6 (Left) or BALB/c (Right) mice were engrafted with B16-F10 murine melanoma cells and 4T1 mammary carcinoma cells, respectively. Tumor growth in NK+ and NK- C57BL/6 ( $n = 7$ ) and BALB/c ( $n = 10$ ) mice was monitored using caliper measurements on the indicated days. Statistically significant differences in tumor volume are indicated by asterisks (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ). (B) Autophagy-competent (BECN1+) or -defective (BECN1-) B16-F10 or 4T1 cells were injected s.c. (Left) or in the mammary fat pad (Right), respectively, in control (NK+) and NK-depleted (NK-) C57BL/6 ( $n = 7$ ) and BALB/c ( $n = 10$ ) mice. Tumor growth was monitored using caliper measurements on the indicated days. Statistically significant differences are indicated by asterisks (\* $P < 0.05$ ).

used as autophagy-competent control cells. Stable clones of B16–F10<sub>BECN1–</sub> and 4T1<sub>BECN1–</sub> cells were selected, and their *in vitro* growth was determined (Fig. S4B). The *in vivo* experimental design is shown in Fig. S4C. Fig. 4B demonstrated that in NK+ mice, the volume of B16–F10<sub>BECN1–</sub> and 4T1<sub>BECN1–</sub> tumors (red curves) was significantly reduced compared with that of BECN1+ tumors (black curves). This reduction is most likely due to the ability of NK cells to eliminate autophagy-defective cells more efficiently than autophagy-competent cells. Consistent with this hypothesis, in NK-depleted mice (NK–), the regression of BECN1– tumors was no longer observed (gray vs. red curves). Taken together, these results suggest that blocking autophagy in tumors facilitates and improves their elimination by NK cells *in vivo*.

## Discussion

In this report, we identify autophagy as a major player in the resistance of breast cancer cells to NK-mediated lysis. Our *in vivo* data validate this concept and highlight the inhibition of autophagy as a potential therapeutic approach to improve NK-based cancer immunotherapy. In addition, this report elucidates the mechanism by which autophagy impairs the susceptibility of tumor cells to NK-mediated killing. This study demonstrates that the activation of autophagy under hypoxic conditions causes the degradation of NK-derived GzmB *in vitro*, which compromises the ability of NK cells to eliminate tumor cells. As the impairment of NK-mediated lysis of tumor cells was also observed under starvation conditions, it remains important to determine whether the degradation of GzmB occurs independently of the nature of stimuli involved in the activation of autophagy in target tumor cells.

NK-based immunotherapy is a promising therapy for solid and hematologic cancers, and it can potentially be combined with chemotherapy, radiation, or monoclonal antibody therapy (27). One of the major obstacles for defining successful NK-based therapeutic protocols is the ability of tumor cells to activate several mechanisms that lead to tumor escape from NK-mediated lysis. Extensive efforts have been made in recent years to identify these mechanisms (28). Inefficient killing of tumor cells by NK cells may be due, in part, to the down-regulation of NKG2D-activating ligands on the surface of tumor cells. Consistent with this hypothesis, hypoxia has been reported to increase the shedding of MIC from the surface of prostate cancer cells (23). In MCF-7 cells, however, we did not detect any decrease in the expression of MIC on the surface of H cells, which suggests that in our model, resistance to NK-mediated killing is not related to modulation in the expression of this NKG2D ligand. Interestingly, our data demonstrate a significant up-regulation of the expression of NK cell-inhibiting MHC class I molecules on the surface of hypoxic cells. Although the causal mechanisms underlying this increase remain unknown, our result indicated that resistance to NK-mediated lysis under hypoxia occurs independently of MHC class I expression levels. In addition, it is unlikely that resistance is related to a defect in NK/target cell interaction, as no difference in the formation of conjugates between NK cells and normoxic or hypoxic cells was observed. Based on these data, we exclude the possibility of autophagy-induced destabilization of the immunological synapse in hypoxic tumor cells, as recently described (29). Our results provide evidence that there is no difference in the degranulation level of NK cells when cocultured with normoxic or hypoxic cells. This eliminates the possibility of a defect in the cytotoxic potential of NK cells toward hypoxic tumor cells as a mechanism of resistance. Having demonstrated that NK cells fulfill their cytotoxic functions toward both hypoxic (H) and normoxic (N) cells, and that exogenous GzmB was unable to kill hypoxic tumor cells, we propose that autophagy operates as an intrinsic resistance mechanism in tumor cells.

The delivery of the lytic effector proteins perforin and granzymes to target cells occurs by at least three mechanisms. GzmB

can be taken up by endosomes within the target cell by fluid-phase endocytosis or by mannose 6–phosphate receptor (M6PR)-mediated endocytosis (30). The third mechanism involves heat shock protein 70 (HSP70) bound to GzmB at the cell surface (31). We did not detect any differences in the cell surface expression of HSP70 or M6PR of normoxic and hypoxic cells (Fig. S5). These results rule out a defect in the transfer of the lytic effector proteins, perforin and granzymes, to hypoxic target cells. It is still debated whether granzymes enter via perforin pores formed at the plasma membrane or whether perforin and granzymes are endocytosed with subsequent release of granzymes from endosomes into the cytoplasm (32). Recent studies indicated that perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which removes perforin and granzymes from the plasma membrane to enlarged early endosomes called “gigantosomes.” Subsequently, perforin forms pores in the gigantosome membrane, allowing for the gradual release of GzmB (33). Once released inside target cells, GzmB initiates apoptotic cell death. It has been reported that early endosomes can fuse with autophagic vacuoles to form amphisomes. This seems to be a prerequisite for the maturation of autophagic vacuoles, their subsequent fusion with lysosomes, and the formation of autophagolysosome (34). Based on these findings, we propose that during the intracellular trafficking, GzmB is subjected to degradation in autophagosomes under hypoxic conditions *in vitro*. Several data reported in this study support such a mechanism: *i*) the level of NK-derived GzmB detected in hypoxic cells is significantly lower than that in normoxic cells; *ii*) inhibition of autophagy by targeting BECN1 restores the level of GzmB and subsequently restores NK-mediated lysis of hypoxic cells; and *iii*) NK-derived GzmB is detected in LC3- and Rab5-positive cellular compartments, suggesting its presence within amphisomes in hypoxic cells. Together, our data identify a potential mechanism by which autophagy impairs the susceptibility of tumor cells to NK-mediated lysis *in vitro*. A schematic representation of this mechanism is provided in Fig. S6.

To evaluate the impact of autophagy on the regulation of NK-mediated immune responses to tumors *in vivo*, we used C57BL/6 and BALB/c mice transplanted with syngeneic murine B16–F10 melanoma and 4T1 breast adenocarcinoma tumor cells. The use of B16–F10 transplantation in mice to evaluate the role of autophagy *in vivo* provides several advantages, as previously reported (16). Our results clearly demonstrate that NK cells control B16–F10 and 4T1 tumor development *in vivo*, as the depletion of NK cells dramatically increases tumor growth. After establishing the role of NK cells in the control of both B16–F10 and 4T1 tumor growth, we further demonstrated that the growth of genetically engineered autophagy-defective B16–F10 and 4T1 cells was substantially inhibited in immunocompetent mice. Our data, demonstrating that an inhibition of tumor growth was no longer observed when NK cells were depleted, highlight the key role of autophagy in the impairment of NK-mediated tumor cell killing *in vivo*.

The TME plays a critical role in the control of immune protection by a number of overlapping mechanisms, which ultimately lead to tumor evasion from immunosurveillance. Tumors have evolved to use hypoxic stress to their own advantage by activating key biochemical and cellular pathways that are important for progression, survival, and metastasis. In this regard, our study underlines the inhibition of autophagy as a cutting-edge approach for the formulation of more effective NK-based cancer immunotherapies. Although there are several ongoing clinical trials using NK cells for cancer treatment, this study highlights the importance of integrating autophagy inhibitors as an innovative strategy in NK-based cancer immunotherapy.

## Materials and Methods

**Cytotoxicity Assay.** Target cells were labeled with 10  $\mu$ M of CellTrace carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen), cocultured with effector cells at 1/1 and 5/1 effector to target cell (E/T) ratios for 4 h at

37 °C and analyzed by flow cytometry (FACSCanto). TO-PRO-3 (Invitrogen) was used to assess cell death. HLA-class I was blocked using a mouse IgM anti-pan HLA class I A6-136 mAb (35).

**Granzyme B Transfer.** YT-INDY-NK cells ( $1.25 \times 10^6$ ) were cocultured with target cells (E/T ratio: 5/1) at 37 °C for 0 and 30 min, washed twice with a solution of 1% (vol/vol) FCS and 2 mM EDTA in PBS, and submitted to high-speed vortexing to disrupt E/T conjugates. Target cells were separated from NK cells using a CD56 MicroBeads kit (Miltenyi Biotec). The purity of the fraction containing the target MCF-7 cells was assessed by flow cytometry (FACSCanto). The presence of granzyme B in target cells was evaluated by immunoblot. The transfer of granzyme B to target cells was also assessed using a Laser scanning microscopy (LSM)-510-Meta (Carl Zeiss) after incubation with GFP-granzyme B-expressing YT-INDY-NK cells.

**Subcellular Fractionation.** Normoxic or hypoxic MCF-7 cells were treated with e64d and pepstatin before incubation with YT-INDY-NK cells for 30 min at 37 °C. Following separation from NK cells, subcellular fractionation of the target cells was performed according to the protocol established by Fulvio Reggiori (Department of Cell Biology, University Medical Centre Utrecht, Utrecht, The Netherlands) to isolate autophagosomes. Details of the experimental procedure are described in the *SI Materials and Methods*.

**In Vivo Experiments.** Ten-week-old C57BL/6 or 7-wk-old BALB/c female mice were injected s.c. with anti-asialo GM1 antibody (3.8 mg per mouse) (Cedarlane CL8955) at indicated days to generate NK-depleted mice (NK<sup>-</sup>). The experimental design is presented in Fig. 4B, Upper. Control (NK<sup>+</sup>) mice were injected with normal rabbit IgG (3.8 mg per mouse) (Dako). Three

days after the first NK cell depletion, mice were injected with tumor cells. C57BL/6 mice were injected s.c. with control (B16-F10<sub>BECN1+</sub>) or autophagy-defective (B16-F10<sub>BECN1-</sub>) B16-F10 cells ( $2.3 \times 10^5$  cells per mouse). BALB/c mice were injected orthotopically in the mammary fat pad with control (4T1<sub>BECN1+</sub>) or autophagy-defective (4T1<sub>BECN1-</sub>) 4T1 cells ( $5 \times 10^4$  cells per mouse). Tumor growth was monitored using caliper measurements on the indicated days, and tumor volume was calculated as follows: Volume (cm<sup>3</sup>) = (width × length × height) × 0.5236. C57BL/6 and BALB/c mice were killed on days 15 and 20, respectively. Animal experiments have been approved by the national and institutional (CRP-Sante) review boards responsible for animal studies in Luxembourg.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank Prof. Rolf Bjerkvig (University of Bergen) for helpful discussions and critical reading of the manuscript; Dr. Beth Levine (University of Texas Southwest Medical Center) for providing MCF-7<sub>BECN1</sub> tet-off cells; Prof. Alessandro Moretta (Department of Experimental Medicine, University of Genova) for providing anti-pan HLA class I A6-136 mAb; and Dr. Fulvio Reggiori (University Medical Centre Utrecht). We also thank Dr. Etienne Moussay, Dr. Jérôme Paggetti, Hakim Boulenouar, Loredana Jacobs, Virginie Baus, and Nicolaas H. C. Brons for technical assistance. This work was supported by grants from Public Research Center for Health, Luxembourg (REC-LHCE-2009-0201) and Fondation Cancer, Luxembourg (FC/2012/02) (to B.J.); grants from the Ligue Contre le Cancer (Comité de Val de Marne), Institut National du Cancer (10128), and Association de Recherche sur le Cancer (R01354) (to S.C.); and by the Canadian Institutes of Health Research (to R.C.B. and I.S.G.). J.B. is a recipient of an Aide à la Formation-Recherche (AFR) grant (2009-1201) from the Fonds National de la Recherche, Luxembourg. S.C. and B.J. were coprincipal investigators of this work.

- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G (2006) Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6(10):715–727.
- Whiteside TL (2008) The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27(45):5904–5912.
- Swartz MA, et al. (2012) Tumor microenvironment complexity: Emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res* 72(10):2473–2480.
- Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H (2002) New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2(11):850–861.
- Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO (2006) Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107(1):159–166.
- Smyth MJ, et al. (2000) Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191(4):661–668.
- Lv L, et al. (2011) The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 6(3):e18219.
- van Herpen CM, et al. (2005) Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor. *Clin Cancer Res* 11(5):1899–1909.
- Ishigami S, et al. (2000) Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88(3):577–583.
- Ménard C, et al. (2009) Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. *Cancer Res* 69(8):3563–3569.
- Stanietsky N, Mandelboim O (2010) Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity. *FEBS Lett* 584(24):4895–4900.
- Stern-Ginossar N, Mandelboim O (2009) An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 128(1):1–6.
- Kärre K, Ljunggren HG, Pirotek G, Kiessling R (2005) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. 1986. *J Immunol* 174(11):6566–6569.
- Campoli M, Ferrone S (2008) Tumor escape mechanisms: Potential role of soluble HLA antigens and NK cells activating ligands. *Tissue Antigens* 72(4):321–334.
- Lee CT, Mace T, Repasky EA (2010) Hypoxia-driven immunosuppression: A new reason to use thermal therapy in the treatment of cancer? *Int J Hyperthermia* 26(3):232–246.
- Noman MZ, et al. (2011) Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res* 71(18):5976–5986.
- Bosco MC, Varesio L (2012) Dendritic cell reprogramming by the hypoxic environment. *Immunobiology* 217(12):1241–1249.
- Youssef MM, Symonds P, Ellis IO, Murray JC (2006) EMAP-II-dependent lymphocyte killing is associated with hypoxia in colorectal cancer. *Br J Cancer* 95(6):735–743.
- Chouaib S, et al. (2012) Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape. *Front Immunol* 3:21.
- Grimshaw MJ, Naylor S, Balkwill FR (2002) Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol Cancer Ther* 1(14):1273–1281.
- Sceney J, et al. (2012) Primary tumor hypoxia recruits CD11b+Ly6Cmed/Ly6G+ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res* 72(16):3906–3911.
- Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P (2010) The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ. *Nat Rev Immunol* 10(8):554–567.
- Siemens DR, et al. (2008) Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: Role of nitric oxide. *Cancer Res* 68(12):4746–4753.
- Noman MZ, Janji B, Berchem G, Mami-Chouaib F, Chouaib S (2012) Hypoxia-induced autophagy: A new player in cancer immunotherapy? *Autophagy* 8(4):704–706.
- Michaud M, et al. (2011) Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334(6062):1573–1577.
- Heppner GH, Miller FR, Shekhar PM (2000) Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2(5):331–334.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5):646–674.
- Ljunggren HG, Malmberg KJ (2007) Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 7(5):329–339.
- Wildenberg ME, et al. (2012) Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse. *Gastroenterology* 142(7):1493–1503.
- Wolk ME, Trapani JA (2004) Cytotoxic activity of the lymphocyte toxin granzyme B. *Microbes Infect* 6(8):752–758.
- Gross C, Koelch W, DeMaio A, Arispe N, Multhoff G (2003) Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J Biol Chem* 278(42):41173–41181.
- Lopez JA, Brennan AJ, Whisstock JC, Voskoboinik I, Trapani JA (2012) Protecting a serial killer: Pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol* 33(8):406–412.
- Thiery J, et al. (2011) Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol* 12(8):770–777.
- Longatti A, Tooze SA (2012) Recycling endosomes contribute to autophagosome formation. *Autophagy* 8(11):1682–1683.
- Ciccone E, et al. (1995) General role of HLA class I molecules in the protection of target cells from lysis by natural killer cells: evidence that the free heavy chains of class I molecules are not sufficient to mediate the protective effect. *Int Immunol* 7(3):393–400.



# Supporting Information

Baginska et al. 10.1073/pnas.1304790110

## SI Materials and Methods

**Cell Culture, Treatment, and Transfection.** Human MCF-7 and T47D breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% (vol/vol) FCS, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Lonza). MCF-7beclin1 (BECN1) tetracycline-responsive promoter (tet-off) cells, which were kindly provided by B. Levine (University of Texas Southwest Medical Center, Dallas), were maintained in RPMI-1640 supplemented with 200  $\mu$ g/mL hygromycin and 100 ng/mL doxycycline (1).

Cell transfections were performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. MCF-7 cells were stably transfected with a GFP-LC3-encoding vector containing a geneticin resistance gene for selection (kindly provided by N. Mizushima, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo). ATG5-defective MCF-7 cells (ATG5<sup>-</sup>) were generated by stable infection with ATG5 shRNA lentiviral particles (Santa Cruz Biotechnology) containing a puromycin resistance gene for selection. Control MCF-7 cells (ATG5<sup>+</sup>) were infected with scrambled shRNA. Targeting p62/SQSTM1 was performed by transfection of cells with p62 siRNA (Qiagen). Unless otherwise indicated, hypoxia was generated by incubating cells in 0.1% (vol/vol) pO<sub>2</sub> for 16 h. Alternatively, autophagy was induced by cultivating cells in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) for 16 h. Lysosomal hydrolases were inhibited by treatment of cells with e64d/pepstatin (200 ng/mL) for 16 h. Inhibition of autophagic flux was performed by incubating cells with chloroquine (60  $\mu$ M) for 1 h. YT-Indy-natural killer (NK) cells, expressing eGFP-granzyme B, were used for specific experiments and were grown as previously described (2). Murine melanoma B16-F10 cells were obtained from the ATCC and grown in DMEM supplemented with 10% (vol/vol) FCS. YT-Indy-NK cells, expressing eGFP-granzyme B, were used for specific experiments and were grown as previously described (2). Murine mammary carcinoma 4T1 cells were obtained from the ATCC and grown in RPMI-1640 supplemented with 10% (vol/vol) FCS. Cells were stably infected with either scrambled or Beclin1 shRNA lentiviral particles (Santa Cruz Biotechnology) containing a puromycin resistance gene for selection.

**NK Cell Isolation.** Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy donors. An NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) was used to isolate NK cells from the PBMC according to the manufacturer's instructions. The purity and viability of isolated NK cells were evaluated by flow cytometry ( $\geq 98\%$  and 98%, respectively). NK cells were activated for 20 h in RPMI-1640 medium supplemented with 300 U/mL of human recombinant Interleukin-2 (R&D Systems).

**Subcellular Fractionation.** Cells were harvested and homogenized in buffer containing 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM acetic acid, 10 mM triethanolamine, 20 mM *N*-ethylmaleimide, and 2 mM PMSF, pH 7.4. Cells were disrupted by passing them through a 25G needle five times, and a clear homogenate was generated by two consecutive centrifugations at 1,000  $\times g$  for 5 min at 4 °C. The supernatant (500  $\mu$ L) was loaded onto the top of a discontinuous OptiPrep (Axis-Shield) gradient [0.75 mL each of 30, 26, 22, 18, 14, and 10% (vol/vol) solutions] and submitted to ultracentrifugation at 268,000  $\times g$  for 310 min in a MLS-50 rotor (k factor = 71, Optima MAX-XP centrifuge, Beckman). Twelve fractions (400  $\mu$ L) were collected from the

top of the gradient, lysed in 1 $\times$  Laemmli buffer, and analyzed by immunoblot.

**Granzyme B Loading.** Cells ( $1.5 \times 10^5$  cells) were loaded with exogenous granzyme B (GzmB) from human lymphocytes (Enzo Life Sciences) using sublytic doses of preactivated pore-forming protein streptolysin-O (SLO) (Sigma). Cells were washed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), followed by the addition of 100  $\mu$ L of HBSS with 0.5% (vol/vol) FBS and 100 nM of both GzmB and SLO. The cells were incubated for 2 h at 37 °C before analysis using multicolor flow cytometry (FACSCanto). Results are reported as a percentage of death for normoxic (N) and hypoxic (H) cells and normalized to cells treated with SLO alone.

**Flow Cytometry Analysis.** Cells were stained for 30 min at 4 °C with the following antibodies: HLA-ABC-phycoerythrin (PE) and NK1.1-PE/Cy7 (BioLegend); HLA-E-PE and HLA-G-APC (eBiosciences); ULBP-1-PE, MIC-A/B-PE, and MIC-A-APC (R&D Systems); CD56-PE/Cy7 and CD3-FITC (ImmunoTools); and CD107a-APC and CD49b-APC (BD Biosciences). Surface expression levels of each protein were assessed using flow cytometry (FACSCanto).

**Cell Lysates and Immunoblot.** Cells were lysed in RIPA Buffer (Sigma Aldrich) supplemented with a protease and phosphatase inhibitor mixture (Roche). Lysates were centrifuged at 15,000  $\times g$  for 20 min at 4 °C, and supernatants were collected. Protein concentration was determined using a BioRad protein assay kit. Proteins were separated by SDS/PAGE, transferred onto PVDF membranes, and blocked with 5% (vol/vol) skim milk in 0.1% (vol/vol) Tween 20 in TBS. The following primary antibodies were used: HIF-1 $\alpha$  and p62 (BD Biosciences); LC3B, Beclin1, granzyme B, Atg5, Smac, Calnexin, heat shock protein (HSP) 70, and Histone H3 (Cell Signaling); actin (Sigma Aldrich); perforin (Biolegend); EEA1 Rab5A (Santa Cruz Biotechnology); GFP (Chemicon); and M6PR (Abcam). After incubation with primary antibodies, immunoreactive bands were detected using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson Immuno Research Laboratories). Protein bands were revealed by enhanced chemiluminescence ECL (GE Healthcare).

**Time-Lapse Live Video Microscopy and Confocal Imaging.** Cells were precultured under normoxic or hypoxic conditions for 24 h. Isolated NK cells were preactivated as described above and stained with PKH-26 (red) (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. GFP-LC3-expressing normoxic or hypoxic MCF-7 cells were incubated with labeled NK cells at a 5/1 E/T ratio in  $\mu$ -Slide eight-well chambered coverslips (IBIDI) and analyzed with a Zeiss LSM-510 Meta laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss). In specific time-lapse experiments, propidium iodide (1.5  $\mu$ M) was added to the cell culture medium as a cell death indicator. Cells were maintained at 37 °C in a CO<sub>2</sub> incubator mounted on the microscope stage. Time-lapse microscopy was performed using an Axiovert 200M microscope (Carl Zeiss MicroImaging), and images were captured with a 40 $\times$  oil objective lens at intervals of one frame per 1–2 min during 82 min for normoxic cells and 86 min for hypoxic cells.

For specific experiments, autophagosomes and endosomes were visualized using an LSM-510-Meta confocal microscope (Carl Zeiss). These cellular structures were detected after staining with anti-LC3 (Cell Signaling) and anti-EEA1 (Santa Cruz Biotechnology) primary antibodies, respectively, followed by incubation with Alexa-Fluor-488/568-coupled secondary antibodies. DAPI was used to stain nuclei (blue).

**Cell Doubling-Time Evaluation.** Cell doubling was evaluated using a colorimetric cell viability assay (XTT). Briefly, cells were seeded in 96-well plates, and cell viability was determined every 24 h for 3 d by measuring absorbance at 450 and 630 nm after the addition of 50  $\mu$ L of 1 mg/mL XTT solution (Sigma Aldrich). Growth curves were plotted between 24 and 72 h, and the cell-doubling time was calculated.

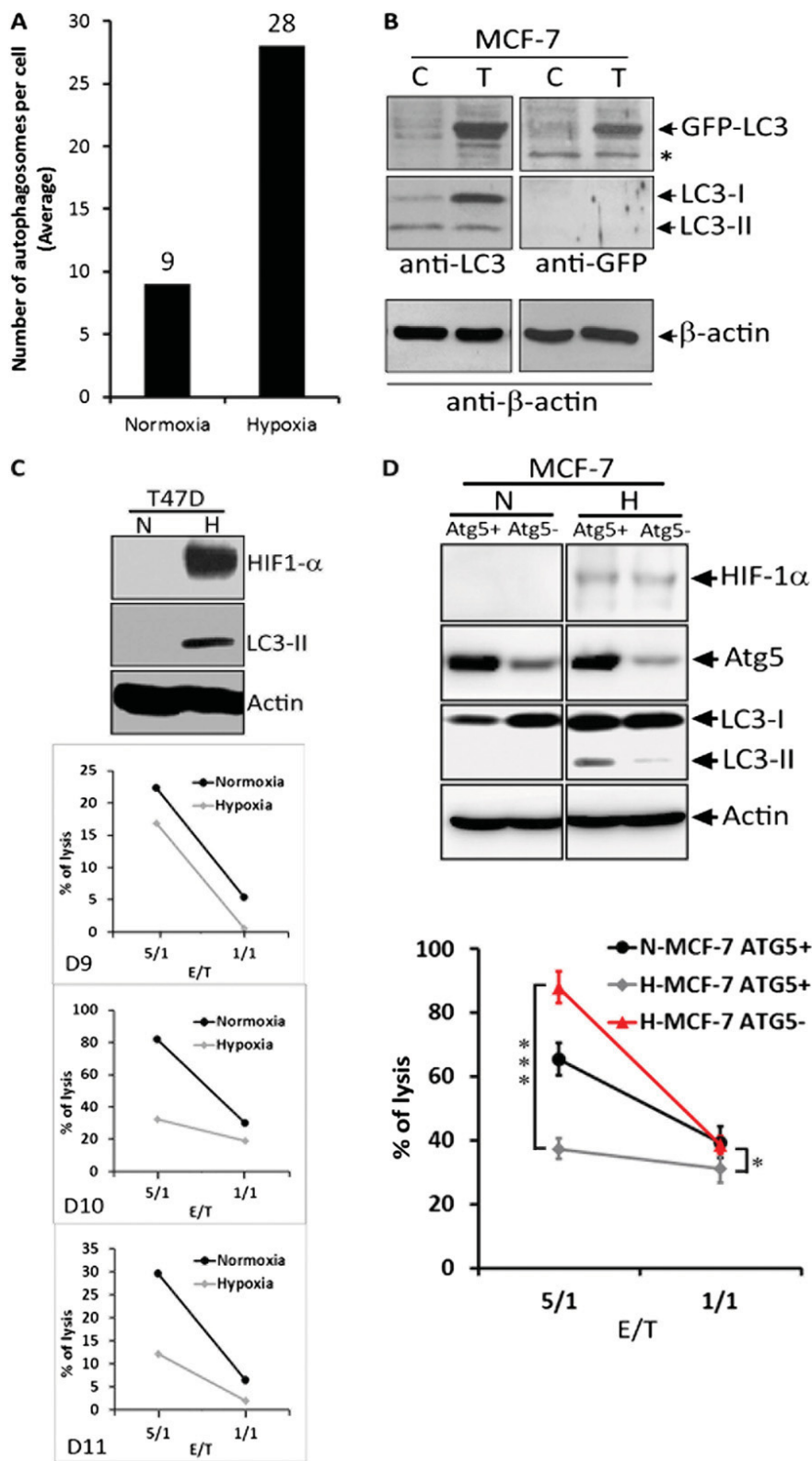
**Formation of Conjugates.** NK cells isolated from healthy donors were stained with PKH-26 (red), and MCF-7 cells were stained with CellTrace CFSE (green) according to the manufacturer's instructions. Effector and target cells (E/T ratio: 5/1) were co-cultured at 37 °C for 0, 5, 10, and 20 min. At each time point, the samples were immediately fixed in ice-cold 0.5% (vol/vol) paraformaldehyde. The double-positive population (E/T conjugates) was assessed using flow cytometry (FACS Aria).

**Degranulation Assay.** Purified and activated NK cells were incubated for 5 h alone or with target tumor cells at a 5/1 E/T ratio in the presence of anti-human CD107a antibody (BD Biosciences). Golgi Stop (BD Biosciences) was added after 1 h of incubation to block intracellular protein transport processes. The NK cells were stained for 30 min with anti-CD56 antibody (ImmunoTools) and LIVE/DEAD dye (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. NK cells incubated without target cells for 5 h were used as a negative control. Samples were analyzed using flow cytometry (FACSCanto).

**Statistical Analysis.** Statistical analyses were performed using a two-tailed Student *t* test. Differences were considered statistically significant when the *P* value was <0.05.

1. Liang XH, Yu J, Brown K, Levine B (2001) Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res* 61(8):3443–3449.

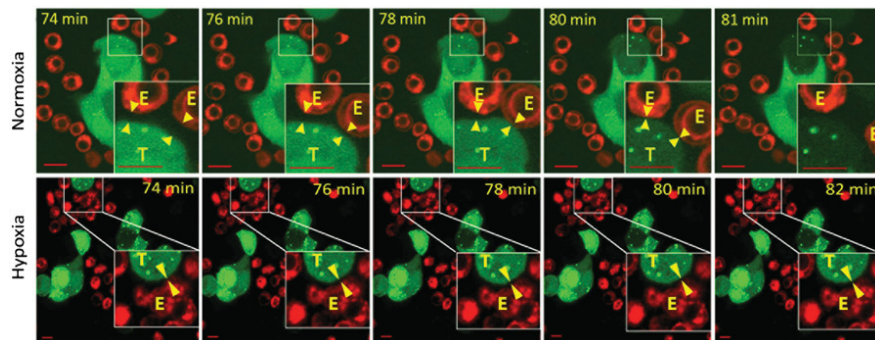
2. Thiery J, et al. (2011) Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol* 12(8):770–777.



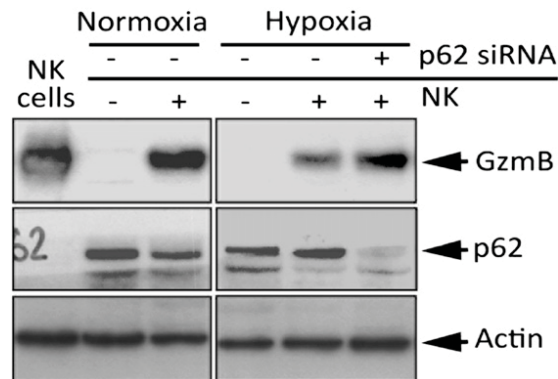
**Fig. S1.** (A) Quantification of the number of autophagosomes from representative images of normoxic and hypoxic MCF7 cells. The number of autophagosomes in 10 cells was counted and reported as an average number of autophagosomes per cell. (B) MCF-7 cells were stably transfected with GFP-LC3 cDNA and maintained in RPMI supplemented with 10% (vol/vol) FBS and geneticin (0.5  $\mu$ g/mL). The expression of exogenous GFP-LC3 was assessed by immunoblot using anti-LC3 or anti-GFP antibodies, as indicated. An actin antibody was used for the loading control. C, control untransfected cells; T, cells transfected with GFP-LC3-encoding vector. The asterisk indicates an unspecific band. (C) Hypoxia-induced autophagy decreases the susceptibility of T47D breast cancer cells to NK-mediated lysis. (C, Upper) T47D cells were cultured under normoxia (N) or hypoxia (H) for 16 h. Expression of HIF-1 $\alpha$  (hypoxia marker) and LC3 (autophagy marker) was assessed by immunoblot. (Right) NK cells were isolated from three different healthy donors (D9 to D11). Cytotoxicity assays were performed as described in Fig. 1A. (C, Lower) Cytotoxicity assays were performed as described in Fig. 1A. (D) Targeting ATG5 restores NK-mediated cytotoxicity against H

Legend continued on following page

MCF-7 cells. (D, Upper) Control (Atg5+) and ATG5-defective (Atg5-) MCF-7 cells were cultured under normoxic or hypoxic conditions. The expression of Atg5, HIF-1 $\alpha$ , and LC3 was assessed by Western blot. (D, Lower) A cytotoxicity assay was performed at 5/1 E/T ratios using NK cells isolated from healthy donors as effector cells and control or ATG5-MCF-7 cells cultured under normoxic or hypoxic conditions as target cells. MCF-7 cell death was assessed using flow cytometry with TO-PRO-3. Statistically significant differences are indicated by asterisks (\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.0005$ ).

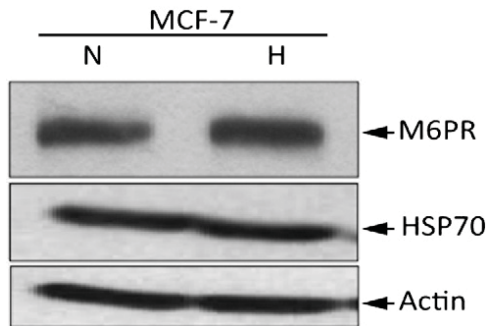


**Fig. S2.** GFP-LC3-expressing MCF-7 cells (green) were precultured onto glass coverslips under N or H conditions. The cells were incubated with PKH-26-stained NK cells (red) at a 5/1 E/T ratio. Interactions between NK and normoxic or hypoxic MCF-7 cells were recorded by time-lapse video microscopy (presented as Movies S1 and S2). At the indicated times, representative images were extracted from the movies. (Scale bar, 10  $\mu$ m.) Images of enlarged regions (boxes) show the interaction between NK cells (E) with both N and H tumor cells (T). (Scale bar, 10  $\mu$ m.)

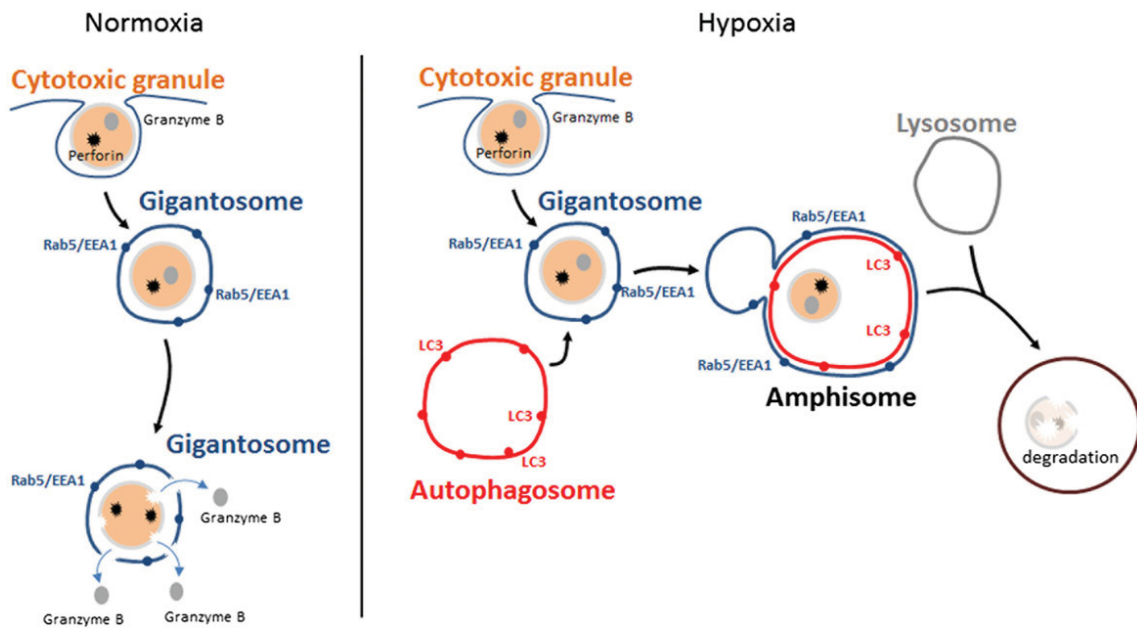


**Fig. S3.** Control (-) or p62/SQSTM1 siRNA transfected-MCF-7 (+) cells were cultured under normoxia or hypoxia for 16 h alone. Tumor cells were presented to NK cells (+) at 5/1 E/T ratio for 30 min. Following separation from NK cells, lysates of tumor cells were subjected to immunoblot analysis to evaluate the GzmB intracellular content. Untreated NK cells lysate (NK cells) was used as control for GzmB detection.

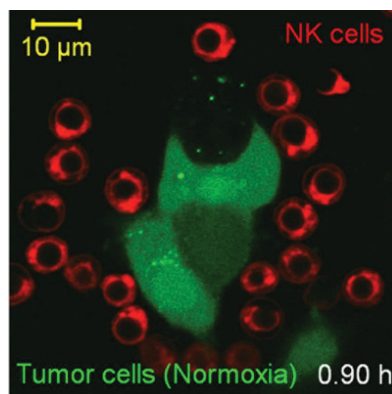




**Fig. S5.** Immunoblot analysis of the expression of M6PR and HSP70 in H and N MCF-7 cells. MCF-7 cells were cultured under normoxia (N) or hypoxia (H) for 16 h. The expression of M6PR and HSP70 was assessed by immunoblot.

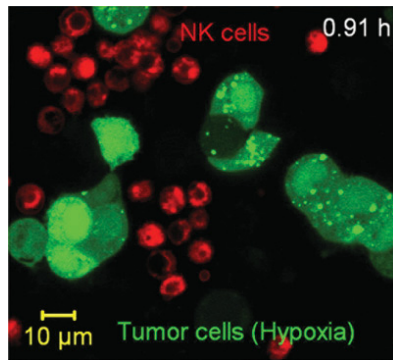


**Fig. S6.** Schematic representation of the mechanism underlying the degradation of GzmB by autophagy under hypoxia. Cytotoxic granules containing perforin and granzyme B are endocytosed into enlarged endosomes called “gigantosomes” in target cells. Under normoxia, perforin forms pores in the gigantosome membrane allowing granzyme B to be gradually released in the cytosol. In hypoxic cells the activation of autophagy leads to the formation of autophagosomes which will fuse with gigantosomes to form amphisomes. The fusion between amphisomes and lysosomes selectively degrades granzyme B in this compartment.



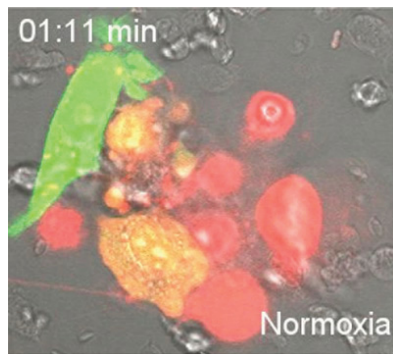
**Movie S1.** Time-lapse video microscopy of NK-mediated lysis of normoxic GFP-LC3-expressing MCF-7 cells. The movie was performed using N cells cultured on  $\mu$ -Slide eight-well chambered coverslips (IBIDI) in the presence of PKH26-stained NK cells from a healthy donor (red) at a 5/1 E/T ratio. The movie was recorded for 1 h 22 min. Images were captured at intervals of one frame every 1–2 min with a Zeiss LSM-510 Meta laser-scanning confocal microscope (Carl Zeiss).

[Movie S1](#)



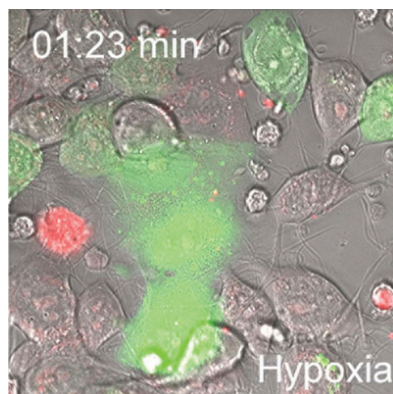
**Movie S2.** Time-lapse video microscopy of NK-mediated lysis of hypoxic GFP-LC3-expressing MCF-7 cells. The movie was performed using H cells cultured on  $\mu$ -Slide eight-well chambered coverslips (IBIDI) in the presence of PKH26-stained NK cells from a healthy donor (red) at a 5/1 E/T ratio. The movie was recorded for 1 h 26 min. Images were captured at intervals of one frame every 1–2 min with a Zeiss LSM-510 Meta laser-scanning confocal microscope (Carl Zeiss).

[Movie S2](#)



**Movie S3.** Time-lapse video microscopy of NK-mediated lysis of normoxic GFP-LC3-expressing MCF-7 cells in the presence of cell death indicator. The movie was performed using normoxic cells cultured on  $\mu$ -Slide eight-well chambered coverslips (IBIDI) in the presence of propidium iodide (PI) (1.5  $\mu$ M) and NK cells from a healthy donor at a 5/1 E/T ratio. Tumor cell killing was recorded by time-lapse video microscopy using AxioVert 200M microscope (Carl Zeiss Micro-Imaging), and images were captured using  $\times$ 40 oil objective lens at intervals of one frame per 20 s.

[Movie S3](#)



**Movie S4.** Time-lapse video microscopy of NK-mediated lysis of hypoxic GFP-LC3-expressing MCF-7 cells in the presence of cell death indicator. The movie was performed using hypoxic cells cultured on  $\mu$ -Slide eight-well chambered coverslips (IBIDI) in the presence of propidium iodide (PI) (1.5  $\mu$ M) and NK cells from a healthy donor at a 5/1 E/T ratio. Tumor cell killing was recorded by time-lapse video microscopy using AxioVert 200M microscope (Carl Zeiss Micro-Imaging), and images were captured using  $\times$ 40 oil objective lens at intervals of one frame per 20 s.

[Movie S4](#)

## **Discussion générale**



Dans cette thèse nous avons tenté d'apporter une contribution à la meilleure connaissance des mécanismes de régulation de la réponse immunitaire par le microenvironnement tumoral hypoxique et plus particulièrement de la réponse immunitaire anti tumorale par les cellules NK.

Dans un des deux articles de cette thèse nous montrons que la cytotoxicité médiée par les cellules NK est clairement réduite dans les conditions hypoxiques que l'on retrouve dans la plupart des tumeurs humaines, et que le mécanisme en jeu lors de cette réduction implique la dégradation du granzyme B à l'intérieur de la cellule cible par la machinerie autophagique enclenchée par l'hypoxie.

Dans l'autre article décrit dans cette thèse, nous montrons que la cellule NK est également elle-même inhibée dans ses fonctions cytotoxiques envers les cellules tumorales par le microenvironnement tumoral hypoxique. Ici l'intermédiaire de cette inactivation des NK est les microvésicules secrétées par la cellule tumorale. Ces microvésicules contiennent de nombreuses protéines et acides nucléiques potentiellement impliqués dans l'immunoévasion, et parmi ceux-ci nous en désignons deux, le TGF- $\beta$  et le miR-23a qui tous les deux à leur propre manière provoquent une diminution de l'expression des récepteurs activateurs des NKs, le NKG2D ainsi que LAMP1/CD107a, et sont ainsi capables de diminuer l'agressivité des cellules NK tumorales. Ces deux mécanismes décrits dans cette thèse s'inscrivent dans une stratégie plus globale et déjà beaucoup étudiée de la tumeur et de son microenvironnement de réprimer les tentatives du système immunitaire d'attaquer la tumeur et de la détruire, chose qui en général est fort bien réussie par ce même système immunitaire faute de quoi notre organisme serait envahi par des cellules tumorales dès notre plus jeune enfance.

Nous pensons que les résultats montrés dans cette thèse sont innovants et s'inscrivent de façon plus large dans le domaine.

## **L'autophagie induite par l'hypoxie et son implication dans l'immunoévasion des cellules NK**

Bien que l'autophagie ait été reconnue comme cheville ouvrière de l'immunoévasion tumorale depuis longtemps de par son implication dans l'inhibition de la lyse CTL selon un mécanisme impliquant STAT3 (Noman et al., 2011), la réponse cellulaire NK était nettement moins étudiée et l'implication de l'hypoxie et de l'autophagie des cellules tumorales induite en condition hypoxique n'était moins bien comprise.

Bien que les mécanismes par lesquels la cellule NK reconnaît et attaque la cellule tumorale sont connus de longue date, il n'était pas encore clair comment et à quel niveau ces mécanismes sont régulés voire abolis par le microenvironnement tumoral.

Les cellules NK peuvent influencer le microenvironnement tumoral essentiellement de trois manières, par cytotoxicité directe, la sécrétion de cytokines et par l'expression de molécules de costimulation à leur surface (Zimmer, 2010). C'est au niveau de la synapse immunologique que ces interactions diverses vont aboutir à la sécrétion de Granzyme B et de Perforine dans un granule sécrété par la cellule NK (Young et al., 1986), ce granule cytotoxique est alors internalisé par la cellule cible dans un gigantesome qui se voit perforer (perforine) sa membrane à l'intérieur de la cellule cible et libérer le granzyme B qui active alors la cascade apoptotique.

Dans ce travail nous avons montré que le Granzyme B incorporé dans les cellules tumorales et provenant de la cellule NK est dégradé par un mécanisme sélectif,

autophagie dépendant et est donc nettement plus dégradé dans les cellules autophagie compétentes en hypoxie que en normoxie. Ceci explique donc que les cellules NK sont incapables d'exercer leur cytotoxicité dans ces conditions et pourquoi la cellule tumorale n'est pas détruite. Cette observation a évidemment une portée plus large vu que elle indique que les stratégies d'immunothérapie sélectives comme les inhibitions des « checkpoints » vont toujours se heurter au problème de l'hypoxie et de l'autophagie induite par l'hypoxie vu que c'est le mécanisme de cytotoxicité lui-même qui est altéré en condition d'autophagie.

La connaissance de ce mécanisme nous permettra probablement de trouver une parade qui pourrait être par exemple le blocage sélectif de ce mécanisme d'autophagie, ou alors le blocage des effets de l'hypoxie en amont par des moyens pharmacologiques. En effet il y a des molécules en développement dans ces deux optiques.

Dans le domaine de l'hypoxie, de nombreux groupes et firmes pharmaceutiques sont en train de développer des molécules visant à inhiber les effets engendrés par l'hypoxie qui peuvent être utilisés seuls ou en association avec un traitement chimiothérapeutique ou radiothérapeutique dans l'optique d'une radio ou chimiosensibilisation (Nagasawa et al., 2006).

Dans le domaine de la recherche en autophagie, on a par exemple pu identifier des candidats comme le PIK-III qui est un inhibiteur sélectif du VPS34 qui semble agir sur le complexe initiateur de l'autophagie qui implique le PI3K (Dowdle et al., 2014). Le cancer était d'ailleurs la première maladie où des études cliniques ont été menées avec le but d'enrayer la maladie en bloquant l'autophagie (Yang et al., 2011b).

D'autres molécules sont en cours d'évaluation préclinique et clinique comme la chloroquine, pour laquelle un grand nombre d'études cliniques sont en cours dans un contexte de chimio sensibilisateur. Le problème avec la chloroquine est que elle agit aussi sur d'autres voies lysosomales distinctes de l'autophagie ainsi que sur d'autres voies complètement différentes (Janku et al., 2011; Rubinsztein et al., 2012; Yang et al., 2011b), et même que le blocage de l'autophagie, qui a un rôle rénoprotecteur lors de l'administration de cisplatine p.ex., pourrait au contraire être contreproductif pour la chloroquine ainsi que pour d'autres bloqueurs de l'autophagie peu sélectifs entre rein et tumeur (Kimura et al., 2013). Les résultats des quelques études cliniques de phase une conduites p.ex. en association avec un TKI anti EGFR n'ont pas été très encourageantes (Neal, 2014). D'autres résultats très préliminaires chez des patients avec un cancer du poumon K-ras muté et co-traités avec chimiothérapie classique ont été un peu plus optimistes, mais une confirmation est nécessaire (Biren Saraiya, 2014).

D'autres inhibiteurs de PI3K, ainsi que de ATG4 et de ATG7 beaucoup plus sélectifs sont en évaluation pré-clinique et clinique précoce et les résultats sont en attente (Rubinsztein et al., 2012).

### **Microvésicules tumorales hypoxiques secrétées dans le microenvironnement et leur rôle dans l'immuno-évasion tumorale**

Comme déjà évoqué plus haut dans cette thèse, le microenvironnement tumoral hypoxique induit une résistance aux médicaments chimiothérapeutiques et promeut l'invasion et les métastases (Barker et al., 2013; Wang et al., 2013; Wang et al., 2014), et que le microenvironnement tumoral peut être rendu immunotolérant par échange de

microvésicules entre la tumeur et le système immunitaire (Liu et al., 2013; Muturi et al., 2013). Nos résultats confirment et abondent dans le sens que les microvésicules tumorales hypoxiques sont capables d'influencer grandement le microenvironnement tumoral et d'induire une immunotolérance.

### **Rôle du mir-23a et du TGF- $\beta$**

Dans ce contexte, nous avons pu démontrer que un mir particulier, le mir-23a et le TGF- $\beta$  sont impliqués dans l'immunomodulation des cellules NK au sein du microenvironnement tumoral et surtout que leur véhicule de la tumeur vers les cellules immunitaires sont des microvésicules tumorales secrétées en condition d'hypoxie.

Le mir-23a a déjà été décrit comme ciblant le TGF- $\beta$  dans l'hépatocarcinome (Huang et al., 2008) ainsi que dans le leucémie aigue promyélocytaire LAM3 ou il est réprimé par l'oncogène PML-RAR, le récepteur de l'acide rétinoïque oncogénique causal de cette leucémie (Saumet et al., 2009). Il a également été décrit comme promoteur tumoral dans le cancer de la vessie, du rein, de l'estomac et du colon (Gottardo et al., 2007; Jahid et al., 2012; Zhu et al., 2010). Un rôle direct dans l'immunomodulation n'est pas décrit à ma connaissance mais le fait qu'il cible TGF- $\beta$ , qui lui est bien décrit dans ce rôle, montre son implication potentielle dans ce mécanisme.

Plus récemment, un travail important a permis d'attribuer au Mir-23a un rôle immunosuppresseur sur la réponse immunitaire CTL dépendante (Chandran et al., 2014a), en effet, les auteurs ont montré que le Mir23-a, inductible par TGF- $\beta$ , cible le mRNA du CD107a/LAMP1 au niveau des lymphocytes cytotoxiques CD8+, ce qui se traduit par une diminution du IFN- $\gamma$  secrétée.

Notre contribution complète cette observation en étendant l'effet à la cytotoxicité NK et en démontrant le rôle important des microvésicules, véritables vecteurs immunomodulateurs au niveau du microenvironnement tumoral.

On peut imaginer de nombreuses utilisations cliniques potentiellement très intéressantes de l'implication des microvésicules dans le microenvironnement immunomodulateur, en effet, la fabrication à grande échelle de ses microvésicules contenant toutes sortes de molécules immunomodulatrices pourrait ouvrir la voie à des stratégies thérapeutiques systémique, mais plus probablement locales au niveau de la tumeur primitive ou des métastases. On pourrait imaginer localement ou de façon systémique redonner au système immunitaire les armes que l'hypoxie et les stratagèmes immunosuppresseurs de la tumeur lui ont enlevées.

## **Perspectives**

L'immunothérapie du cancer a évolué d'une stratégie donnant des réponses significatives de façon presque anecdotiques et non imprédictibles à une vraie thérapeutique anticancéreuse reproductible et efficace avec des remissions de longue durée dans un nombre croissant de patients. Tous les progrès accomplis et à venir dans le domaine de l'immunité anti-tumorale laissent penser que l'immunothérapie prendra une place croissante dans les thérapeutiques du cancer. Cependant, bien que les approches utilisées soient efficaces en termes d'induction d'une réponse immune chez les patients, la proportion de patients développant une réponse clinique objective reste encore insuffisante. Ces résultats cliniques confirment la complexité du système tumoral et mettent en évidence le rôle du microenvironnement tumoral dans le développement de la tolérance immunitaire et l'échappement à la surveillance du système immunitaire. L'analyse dynamique et fonctionnelle du microenvironnement tumoral, dont notre connaissance aujourd'hui est très fragmentaire, demeure un enjeu majeur pour le développement d'une immunothérapie cliniquement plus efficace. Ainsi, les efforts s'orientent actuellement à réaliser un décryptage fin de l'interaction entre le système immunitaire et le microenvironnement tumoral avec comme but d'élaborer de nouvelles stratégies d'immunothérapie, seules ou en association avec les thérapeutiques conventionnelles.

Dans ce contexte, nos travaux ont permis de révéler l'existence de plusieurs nouveaux mécanismes de résistance qui ne s'excluent pas mutuellement. Ces mécanismes se développent et opèrent dans le microenvironnement tumoral hypoxique. Cependant, nos résultats ont permis d'établir des perspectives pour de futures investigations visant à modifier les propriétés immunosuppressives du microenvironnement et d'établir ainsi un



microenvironnement immunopermissif plus favorable à l'attaque du système immunitaire.

### **Perspective pour l'article 1**

Nous avons démontré que les cellules NK étaient capables d'internaliser les MVs dérivées des cellules tumorales normoxiques et hypoxiques, mais seules les MVs hypoxiques étaient capables de diminuer considérablement leurs capacités cytotoxiques anti-tumorales. Il est à noter que la cytotoxicité des cellules NK a été légèrement altérée par les MVs normoxique et que cette diminution est corrélée avec une diminution modeste de CD107a et l'IFN- $\gamma$ . Il serait donc important de déterminer le mécanisme responsable de cette légère diminution par les MVs normoxiques. L'hypothèse la plus probable c'est que l'effet différentiel des MVs normoxiques et hypoxiques pourrait être liée à la concentration des facteurs immunomodulateurs identifiés tels que le miR-23a et le TGF-beta. Il serait donc important de déterminer si l'inhibition de l'expression faible de miR-23a et le TGF-beta dans les MVs normoxique restore cette légère diminution de la cytotoxicité des NKs. Bien que nos données établissent un lien entre l'augmentation de TGF-beta et le miR-23a et une diminution de la cytotoxicité des cellules NKs, une autre question importante se pose qui nécessite une investigation approfondie c'est de savoir si le TGF-beta et le miR-23a sont les seuls facteurs impliqués dans la régulation négative de CD107a, IFN- $\gamma$  et NKG2D dans NK cellules. En effet, une étude récente souligne que le TGF-beta favorise l'expression du cluster miR-23a dans les cellules T CD8 + humains, qui cible spécifiquement l'extrémité 3'UTR de CD107a / LAMP1 ARNm. Fait important, cette étude a également révélé que l'effet de miR-23a n'est pas lié à la présence de TGF-beta,

mais il peut exercer également un effet suppresseur sur les cellules effectrices CD8 +, même en l'absence de TGF-beta. Notre étude montre clairement que les MVs peuvent refléter l'état hypoxique des cellules tumorales. Cependant, il est important d'analyser si ce mécanisme de cross talk entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires peut être responsable de l'anergie des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs.

Sur un plan clinique on pourrait envisager d'utiliser ces MVs comme vecteurs capables de réactiver les cellules NKs, en leur incorporant non pas des facteurs immuno-suppressifs pour les NKs comme le TGF-beta et le miR-23a, mais par des facteurs activateurs des NKs ou un antagoniste-23a. Ces MVs pourraient être administrées en systémique tout comme en intra-tumoral. Par ailleurs des stratégies antiautophagiques (plusieurs molécules en développement) pourraient être intéressantes en association avec une réactivation des NKs.

### **Perspectives pour l'article 2.**

Nous avons démontré que malgré une réponse immunitaire intacte, les cellules tumorales échappent à la surveillance des cellules NK en dégradant la protéase granzyme B par la machinerie autophagique. Nos résultats ont clairement établi que l'inhibition de l'autophagie améliore considérablement la réponse immunitaire antitumorale dépendante des cellules NK chez la souris. L'ensemble de nos travaux ouvrent ainsi la voie à la mise en place de nouvelles applications cliniques en immunothérapie anticancéreuse basées sur la réactivation des lymphocytes cytotoxiques et l'inhibition simultanée de l'autophagie. Cependant nos résultats soulèvent une question majeure qui est de savoir si l'inhibition de l'autophagie améliore également la réponse immunitaire dépendante

des cellules T. En effet, bien que le mécanisme de reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK et les CTL est fondamentalement différent, ces cellules lysent leurs cibles par le même mécanisme de sécrétion des granules cytotoxiques contenant la Granzyme B et la perforine. Il est donc intéressant d'investiguer si le mécanisme de dégradation de Granzyme B par autophagie intervient également dans la réponse immunitaire dépendante de CTL.

L'autophagie a longtemps été considérée comme un processus de dégradation cellulaire non sélectif. Cependant, plusieurs études ont rapporté que l'autophagie peut être un processus de dégradation sélectif dans des conditions de stress. La base moléculaire de l'autophagie sélective comporte plusieurs récepteurs de protéines de cargaison telles que SQSTM1/p62, NBR1, OPTN, CALCOCO2 et / NDP52, qui sont capables d'interagir avec des protéines ubiquitinilées et les cibler dans phagophores afin d'être dégradés dans les lysosomes. Sur cette base, une question importante nécessite une investigation plus approfondie : Est-ce que le granzyme B est dégradé sélectivement par autophagie ou est-il juste une «victime innocente» soumise à une dégradation non sélective dans les cellules tumorales hypoxiques en vertu de l'autophagie excessive? Bien qu'il reste encore beaucoup à investiguer sur le plan mécanistique, plusieurs résultats préliminaires rapportés dans cette thèse confirment la dégradation sélective du granzyme B par autophagie: i) Le niveau de GZMB dans les cellules hypoxiques est rétabli en ciblant SQSTM1; et ii) même si la perforine est détectée dans le même compartiment cellulaire que le GZMB dans les cellules hypoxiques, aucune différence dans le niveau d'expression de la perforine n'a été détectée par rapport à des cellules normoxiques. Cependant, il est nécessaire d'analyser l'ubiquitination du Granzyme B dans les cellules hypoxiques et

d'analyser par approches biochimiques la protéine cargo responsable de son adressage sélectif vers les autophagosomes.

## **Annexe**

## Autophagic degradation of GZMB/granzyme B

### A new mechanism of hypoxic tumor cell escape from natural killer cell-mediated lysis

Elodie Viry,<sup>1,†</sup> Joanna Baginska,<sup>1,†</sup> Guy Berchem,<sup>1</sup> Muhammad Zaeem Noman,<sup>2</sup> Sandrine Medves,<sup>1</sup> Salem Chouaib,<sup>2,‡</sup> and Bassam Janji<sup>1,‡,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Hemato-Oncology; Department of Oncology; Public Research Center for Health; Luxembourg City, Luxembourg;

<sup>2</sup>INSERM U753; Institut de Cancérologie Gustave Roussy; Villejuif, France

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>‡</sup>These authors are co-senior authors.

**T**he crucial issue for defining successful natural killer (NK)-based anticancer therapy is the ability of tumor cells to activate resistance mechanisms leading to escape from NK-mediated killing. It is now well established that such mechanisms are likely evolved under hypoxia in the tumor microenvironment. Here, we show that hypoxia-induced autophagy impairs breast cancer cell susceptibility to NK-mediated lysis and that this impairment is reverted by targeting autophagy. We provide evidence that activation of autophagy in hypoxic cells is involved in selective degradation of the pro-apoptotic NK-derived serine protease GZMB/granzyme B, thereby blocking NK-mediated target cell apoptosis. Our *in vivo* data validate the concept that targeting autophagy in cancer cells promotes tumor regression by facilitating their elimination by NK cells. This study provides a cutting-edge advance in our understanding of how hypoxia-induced autophagy impairs NK-mediated lysis and might pave the way for formulating more effective NK-based antitumor therapy by combining autophagy inhibitors.

Tumor hypoxia is associated with tumor growth, malignant progression, and resistance to therapy, and becomes a central issue in cancer treatment. Hypoxic cells activate signaling pathways that regulate proliferation, angiogenesis, and death. Cancer cells have adapted these pathways, allowing tumors

to survive and grow under hypoxia. Recently, hypoxia in the tumor microenvironment has been reported to suppress the antitumor immune response and to enhance tumor escape from immune surveillance. In line with this concept, we showed that hypoxic breast cancer cells are less susceptible to NK-mediated lysis than normoxic cells. More interestingly, we demonstrated that the resistance of hypoxic cancer cells to NK-mediated killing is strikingly dependent on autophagy activation, as genetic inhibition of autophagy is sufficient to suppress this resistance and restore NK-mediated killing of hypoxic cells. Furthermore, we showed that hypoxia is not a prerequisite event for autophagy-dependent induction of tumor escape from NK. Indeed, we observed that, similar to hypoxia-induced autophagy, starvation-induced autophagy is also able to impair tumor susceptibility to NK-mediated killing. Our results highlight autophagy as a key determinant in tumor cell evasion from NK-mediated killing.

It is well established that a dynamic and precisely coordinated balance between activating and inhibitory receptors governs NK cell activation programs. In our model, no significant differences are observed in the expression of activating and inhibitory receptors on the surface of NK cells, and in the expression of their ligands (except HLA class I molecules) at the surface of normoxic and hypoxic target cells. While the causal mechanism

**Keywords:** hypoxia, autophagy, Granzyme B, breast cancer, natural killer

Submitted: 10/14/2013

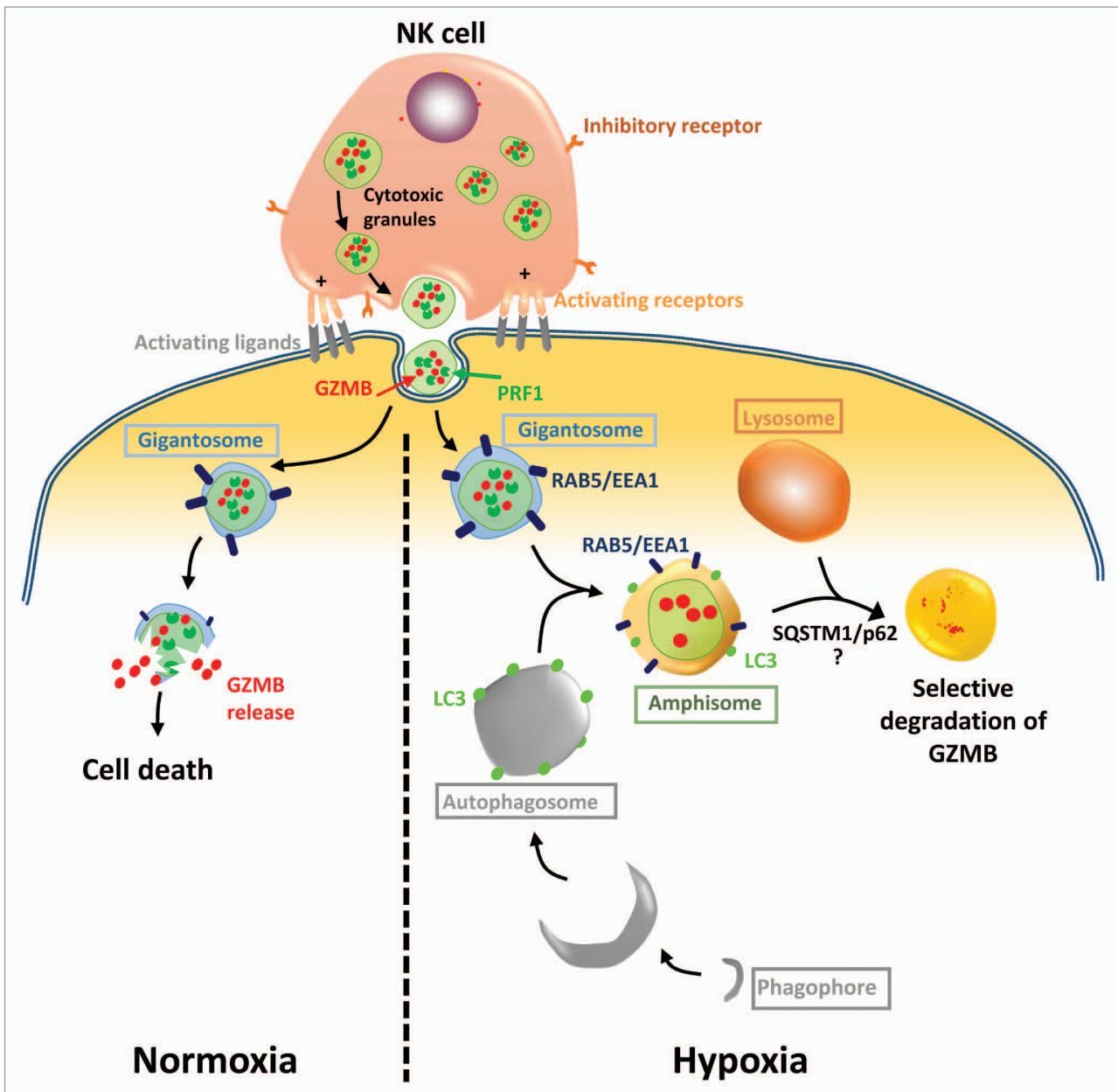
Revised: 10/17/2013

Accepted: 10/23/2013

<http://dx.doi.org/10.4161/auto.26924>

\*Correspondence to: Bassam Janji;  
Email: [bassam.janji@crp-sante.lu](mailto:bassam.janji@crp-sante.lu)

Punctum to: Baginska J, Viry E, Berchem G, Poli A, Noman MZ, van Moer K, Medves S, Zimmer J, Oudin A, Niclou SP, et al. Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:17450–5; PMID:24101526; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1304790110>



**Figure 1.** Selective degradation of NK-derived GZMB by autophagy in hypoxic tumor cells. Following the recognition of their targets NK cells secrete cytotoxic granules containing PRF1, GZMB, and other hydrolytic enzymes to the target cells. These granules enter target cells and traffic to enlarged endosomes marked by RAB5 or EEA1, which are called “gigantosomes.” In normoxic cells, PRF1 forms pores in the gigantosome membrane, allowing the release of GZMB and the initiation of cell death. Under hypoxia, excessive autophagy in target cells leads to the fusion of autophagosomes with gigantosomes containing PRF1 and GZMB and the formation of structures marked with LC3 and RAB5-EEA1 called amphisomes. Although PRF1 is detected in the same subcellular compartment as GZMB, the fusion of amphisomes with lysosomes leads to specific degradation of GZMB in a SQSTM1/p62-dependent manner. The degradation of GZMB by autophagy leads to hypoxic tumor cell escape from NK-mediated killing.

underlying the increase in HLA class I in hypoxic cells remains elusive, we demonstrated, using an HLA class I blocking antibody, that the resistance of hypoxic tumor cells occurs independently of upregulated-HLA class I molecules. Furthermore, we could not observe any

defect in the ability of NK cells to secrete cytotoxic granules toward hypoxic or normoxic cells. Together, our results provide additional clues regarding the critical role of autophagy as an intrinsic mechanism that makes hypoxic tumor cells less sensitive to NK cell attack.

As cancer cells have evolved multiple mechanisms of resistance in order to outmaneuver an effective immune response and escape from immune cell killing, we next focused on autophagy as an intrinsic resistance mechanism operating in hypoxic cells. NK cells recognize and

kill their targets by several mechanisms including the release of cytotoxic granules containing PRF1/perforin and GZMB. It has been recently proposed that PRF1 and GZMB enter target cells by endocytosis and traffic to enlarged endosomes called “gigantosomes.” Subsequently, PRF1 forms pores in the gigantosome membrane, allowing for the gradual release of GZMB and the initiation of apoptotic cell death. The fusion between early endosomes and autophagic vacuoles to form amphisomes seems to be a prerequisite in some cases for the formation of autolysosomes. In keeping with this, we attempted to analyze GZMB content in hypoxic tumor cells. We hypothesized that during intracellular trafficking, GZMB could be exposed to a high risk of being targeted to amphisomes and thereby degraded by autophagy in the lysosomal compartment. Several lines of data reported in this study support such a mechanism: i) the level of NK-derived GZMB detected in hypoxic cells is significantly lower than that in normoxic cells; ii) inhibition of autophagy or lysosomal hydrolases restores the level of GZMB and subsequently restores NK-mediated lysis of hypoxic cells; and iii) NK-derived GZMB is detected in LC3- and RAB5-positive cellular compartments, suggesting its presence within amphisomes in hypoxic cells. Based on these findings, we proposed a mechanism by which GZMB may be degraded by autophagy during its intracellular trafficking leading to cancer cell escape from NK cell attack (Fig. 1).

Autophagy has long been considered as a bulk degradation cell process.

However, several studies have reported that autophagy can be a selective degradation process under stress conditions. The molecular basis of selective autophagy involves several cargo protein receptors such as SQSTM1/p62, NBR1, OPTN and CALCOCO2/NDP52, which are able to interact with ubiquitinated proteins and target them into phagophores in order to be degraded in lysosomes. Based on this, an important issue arises from our results: Is GZMB selectively degraded by autophagy or it is just an “innocent victim” which is subject to a bulk non-specific degradation in hypoxic tumor cells under excessive autophagy? While much remains to be learned mechanistically, several lines of data reported in this study support the selective degradation of GZMB by autophagy: i) The level of GZMB in hypoxic cells is restored by targeting SQSTM1; and ii) even if PRF1 is detected in the same subcellular compartment as GZMB in hypoxic cells, we do not observe any difference in its expression level compared with normoxic cells.

In light of our *in vitro* observations, we investigated whether targeting autophagy enhances *in vivo* an NK-mediated antitumor immune response. We used BALB/c and C57BL/6 mice transplanted with syngeneic murine 4T1 breast adenocarcinoma and B16-F10 melanoma tumor cells, respectively. We first demonstrated that NK cells control *in vivo* B16-F10 and 4T1 tumor development, as the depletion of host NK cells significantly increases tumor growth. There is a significant reduction of tumor volume in autophagy-defective B16-F10 and 4T1

cells presumably as a consequence of potentiation of tumor cell killing by NK cells. Therefore, it would be interesting to investigate whether this improvement is related to the increase in the infiltration/recruitment of different immune subsets in the tumor bed or to the decrease of immune suppressive cells such as T regulatory cells, myeloid-derived suppressor cells or tumor-associated macrophages. Whether targeting autophagy affects the ability of cancer cells to induce an immunosuppressive microenvironment, including the secretion of various immunosuppressive cytokines, also remains an issue of great interest.

Overall, the present study underlines the inhibition of autophagy as a cutting-edge approach to overcome the suppressive effect of the hypoxic tumor microenvironment on the antitumor immune response. This study highlights the importance of integrating autophagy inhibitors as a potential therapeutic approach to improve NK-based cancer immunotherapy.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from Public Research Center for Health (REC-LHCE-2009–0201) and “Foundation Cancer” Luxembourg (FC/2012/02) to BJ and “Association de Recherche sur le Cancer” to SC. JB is a recipient of an AFR grant (2009–1201) from the “Fonds National de la Recherche,” Luxembourg.



## Hypoxia-induced autophagy A new player in cancer immunotherapy?

Muhammad Zaem Noman,<sup>1,†</sup> Bassam Janji,<sup>2,†</sup> Guy Berchem,<sup>2</sup> Fathia Mami-Chouaib<sup>1</sup> and Salem Chouaib<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Unité INSERM U753; Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hemato-Oncology; Department of Oncology; Public Research Center for Health; Luxembourg City, Luxembourg

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**A** major challenge in formulating an effective immunotherapy is to overcome the mechanisms of tumor escape from immunosurveillance. We showed that hypoxia-induced autophagy impairs cytotoxic T-lymphocyte (CTL)-mediated tumor cell lysis by regulating phospho-STAT3 in target cells. Autophagy inhibition in hypoxic cells decreases phospho-STAT3 and restores CTL-mediated tumor cell killing by a mechanism involving the ubiquitin proteasome system and p62/SQSTM1. Simultaneously boosting the CTL-response, using a TRP-peptide vaccination strategy, and targeting autophagy in hypoxic tumors, improves the efficacy of cancer vaccines and promotes tumor regression in vivo. Overall, in addition to its immunosuppressive effect, the hypoxic microenvironment also contributes to immunoresistance and can be detrimental to antitumor effector cell functions.

Despite considerable progress made in the identification of new strategies based on boosting the antigen-specific antitumor responses, the immunotherapy approaches that are currently used in the clinic have only a limited success. The tumor escape from immunosurveillance represents the last series of hurdles to be overcome in formulating a more effective cancer immunotherapy.

In this regard, the hypoxic tumor microenvironment has attracted much attention from immunologists as a major contributor in tumor escape from immunosurveillance. Indeed, several lines

of evidence documented that immune effector cells recruited to the hypoxic tumor site exhibit distinct functions compared with those present in normoxic areas. Subsequently, their antitumor activities are largely attenuated. In addition, immune cells in the tumor microenvironment not only fail to exert their antitumor effector functions, but they are co-opted to promote tumor growth. In this report, we discuss a new insight into how tumor cells escape from (CTL) specific lysis under the conditions of the hypoxic tumor microenvironment.

Using a human non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cell line (IGR-Heu) and the autologous CTL clones, we have previously shown that hypoxic tumor cells are less susceptible to specific T cell receptor (TCR)-dependent lysis. Consistent with the fact that hypoxia can inhibit T cell-mediated immune response, we showed that impairment of tumor cell susceptibility to CTL-mediated lysis under conditions of hypoxia is neither related to an alteration of the effector immune response, nor to a defect in the interaction between effector cells and target cells. However, this impairment was associated with the hypoxia-dependent phosphorylation of STAT3 (pSTAT3) at the Tyr705 residue in the target cells by a mechanism involving, at least in part, vascular endothelial growth factor (VEGF). This study predicts that, despite an apparently intact cytolytic potential of CTL, tumor cells escape CTL-mediated lysis under hypoxic conditions by activating a hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ -dependent intrinsic signaling pathway leading to

**Keywords:** hypoxia, autophagy, adaptive immunity, cancer vaccines

<http://dx.doi.org/10.4161/auto.8.4.19572>

\*Correspondence to: Salem Chouaib;  
Email: [chouaib@igr.fr](mailto:chouaib@igr.fr)

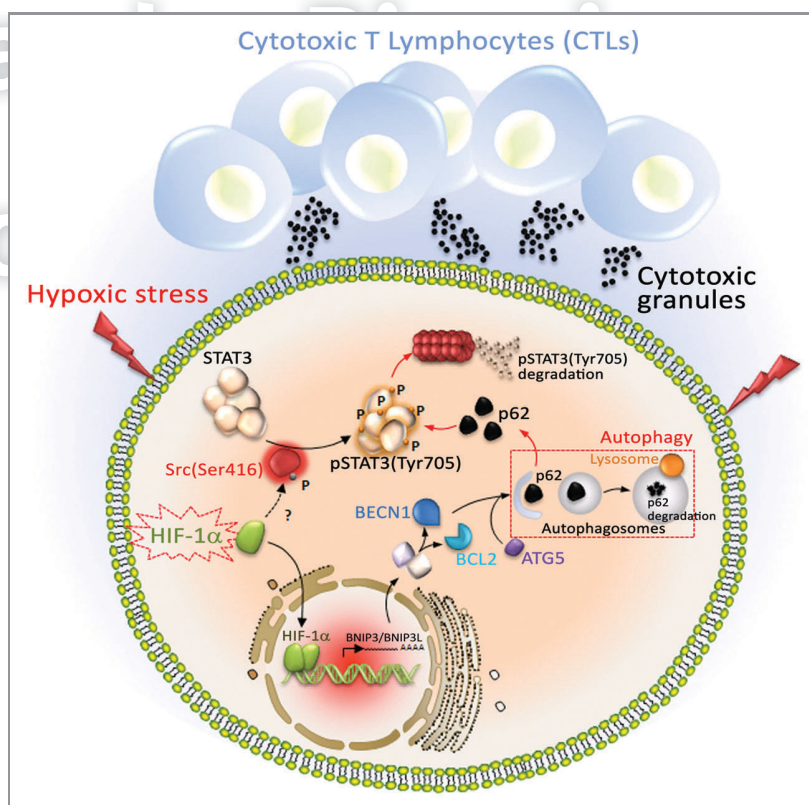
Punctum to: Noman MZ, Janji B, Kaminska B, Van Moer K, Pierson S, Przanowski P, et al. Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res* 2011; 71:5976–86; PMID:21810913; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1094>

STAT3 phosphorylation. Overall, this study highlights pSTAT3 in tumor targets as a key determinant in the regulation of CTL-mediated tumor cell lysis under hypoxia. We have extended our previous findings by showing that STAT3 phosphorylation depends on Src kinase phosphorylation at the Tyr416 residue (pSrc). Indeed, pSrc inhibition by PP2 dramatically decreases pSTAT3 without affecting total STAT3 expression. Consistent with the role of autophagy as a cell protective mechanism in response to oxidative stress, we showed that hypoxia leads to autophagy induction in tumor cells and that the pSTAT3 level is tightly regulated by autophagy. Targeting autophagy with *BECN1* or *ATG5* siRNA significantly decreases hypoxia-dependent induction of pSTAT3 and restores CTL-mediated lysis of tumor cells. This could allow the prediction that autophagy induction under hypoxia plays a role in pSTAT3 stabilization in tumor cells. Given the role of autophagy as a protein degradation system, however, it is difficult to reconcile the idea that the autophagy machinery plays a role in the stabilization of pSTAT3 under hypoxia. The mechanism responsible for the decrease in pSTAT3 level in autophagy-defective hypoxic tumor cells was, therefore, extensively addressed by focusing on the crosstalk mediated through the cargo receptor/adaptor protein p62/SQSTM1 between the ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy. Using genetic and pharmacological approaches to inhibit p62/SQSTM1 and the UPS in either autophagy competent or defective tumor cells, our results unraveled the mechanism by which hypoxia-induced autophagy regulates the level of pSTAT3 (Fig. 1). Indeed, hypoxia-dependent induction of HIF-1 $\alpha$  has two effects in target cells: by an as yet undefined mechanism, HIF-1 $\alpha$  induces pSrc, which subsequently phosphorylates STAT3 at the Tyr705 residue. HIF-1 $\alpha$  also induces autophagy by a mechanism involving the upregulated expression of BNIP3/BNIP3L and the dissociation of the BECN1-BCL2 complex. Autophagy activation results in degradation of the p62/SQSTM1 protein, responsible for the targeting of pSTAT3 to the UPS. In keeping with the fact that

p62/SQSTM1 is the receptor/adaptor protein for pSTAT3 targeting to the UPS, its degradation by autophagy leads to pSTAT3 accumulation. In autophagy-defective cells, p62/SQSTM1 is no longer degraded and its accumulation accelerates the process of pSTAT3 targeting for degradation by the UPS.

In light of our in vitro observation, we investigated whether targeting hypoxia-induced autophagy could affect CTL-mediated tumor cell lysis in vivo. To address this issue, we used the autophagy inhibitor hydroxychloroquine (HCQ) in combination with a tyrosinase-related protein-2 (TRP2) peptide-based vaccination strategy. TRP2 combined with oligodeoxynucleotides containing unmethylated CpG motifs (CpG ODN) vaccination has

been previously reported to be efficient in the induction of tumor cell-specific CTLs. Using a transplantable murine melanoma B16-F10 cell line we first provided evidence that autophagy is primarily detected in hypoxic areas of the tumor. Inhibition of autophagy in B16-F10 engrafted tumors results in a significant decrease in tumor growth by inducing apoptosis, as revealed by TUNEL staining. These results strongly argue for a role of autophagy in mediating hypoxia tolerance to the immune system. More interestingly, we showed a significant decrease in tumor growth of the vaccinated and HCQ-treated group of mice as compared with control and to either treatment alone. Although subcutaneous tumor implantation models have their limits, it would be interesting to perform



**Figure 1.** Model of pSTAT3 regulation by hypoxia-induced autophagy in tumor cells. Hypoxic stress leads to the accumulation of HIF-1 $\alpha$ . By an as yet undefined mechanism, HIF-1 $\alpha$  increases the level of phospho-Src, which subsequently phosphorylates STAT3 at the Tyr705 residue. As HIF-target gene products, BNIP3 and BNIP3L are transcriptionally upregulated and compete with the BECN1-BCL2 complex. This competition releases BECN1 from the complex and then activates the autophagic machinery by recruiting several autophagic proteins including ATG5. As an autophagic substrate, p62/SQSTM1 is degraded in the autophagosomes following their fusion with lysosomes. In view of the fact that p62/SQSTM1 is involved in targeting pSTAT3 to the UPS, its degradation leads to the accumulation of pSTAT3 in cells. In autophagy-defective cells, p62/SQSTM1 is no longer degraded, and its accumulation accelerates the UPS-dependent degradation of pSTAT3.

---

simultaneous boosting of the immune system and inhibition of autophagy in spontaneous animal tumor models. Transgenic mouse models of spontaneous oncogene-driven tumors that are deficient in autophagy could be useful to explore the impact of the hypoxic tumor microenvironment and autophagy inhibition on the antitumor immune responses. Nevertheless, our results strongly argue that in vivo inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of a TRP2-based vaccine. It would be interesting to investigate whether the inhibition of autophagy will affect other parameters of the antitumor T cell activity in vivo and in vitro (i.e., cytokine production, proliferation, activation, etc.). Several other important mediators of immune tolerance such as the number of the myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and the tumor-specific T regulatory cells (Tregs) should also be studied.

It has become increasingly clear that the tumor microenvironment plays a crucial role in the control of immune protection and contains many overlapping mechanisms, which ultimately lead to tumor evasion of antigen-specific immunotherapy. Obviously, tumors have evolved to utilize hypoxic stress to their own advantage by activating key biochemical and cellular pathways that are important for progression, namely survival and metastasis. In this regard, we provided evidence that hypoxia-induced autophagy plays a determinant role in tumor evasion of specific CTL-mediated lysis. Furthermore, our findings establish, for the first time, that simultaneously boosting the immune system and inhibiting autophagy can enhance the therapeutic efficacy of antigen-based cancer vaccines. This study highlights autophagy inhibition in hypoxic tumors as a cutting-edge approach to improve cancer immunotherapy and paves

the way to formulate more effective cancer vaccine-based therapy. While several clinical trials using the autophagy inhibitor hydroxychloroquine in combination with several chemotherapy drugs are currently in progress, trials combining peptide vaccination with autophagy inhibitors could be an innovative strategy in cancer immunotherapy. Integrating clinical and lab findings will be crucial to understand the complex role of hypoxia-induced autophagy in modulating host tumor immunity.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from the ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), Ligue contre le Cancer, INCA (Institut National du Cancer), FNR (Fonds National de la Recherche, Luxembourg) and the Luxembourg Ministry of Culture, Higher Education and Research.

Do not distribute.

## **Bibliographie**

1. Abrahams, V.M., Straszewski, S.L., Kamsteeg, M., Hanczaruk, B., Schwartz, P.E., Rutherford, T.J., and Mor, G. (2003). Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res* *63*, 5573-5581.
2. Akao, Y., Iio, A., Itoh, T., Noguchi, S., Itoh, Y., Ohtsuki, Y., and Naoe, T. (2011). Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages. *Mol Ther* *19*, 395-399.
3. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R.S., Allison, A.C., and Rak, J. (2009). Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 3794-3799.
4. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* *10*, 619-624.
5. Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* *222*, 155-161.
6. Alter, G., Malenfant, J.M., and Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* *294*, 15-22.
7. Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Likhacheva, S., and Wood, M.J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* *29*, 341-345.
8. Amakata, Y., Fujiyama, Y., Andoh, A., Hodohara, K., and Bamba, T. (2001). Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Clin Exp Immunol* *124*, 214-222.
9. Andre, F., Schartz, N.E., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., *et al.* (2002). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* *360*, 295-305.
10. Antonyak, M.A., and Cerione, R.A. (2014). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer. *Methods in molecular biology* *1165*, 147-173.
11. Ashford, T.P., and Porter, K.R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. Cell Biol.* *12*, 198-202.
12. Axelson, H., Fredlund, E., Ovenberger, M., Landberg, G., and Pahlman, S. (2005). Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol* *16*, 554-563.
13. Ay, C., Freyssinet, J.M., Sailer, T., Vormittag, R., and Pabinger, I. (2009). Circulating procoagulant microparticles in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* *123*, 724-726.
14. Baginska, J., Viry, E., Berchem, G., Poli, A., Noman, M.Z., van Moer, K., Medves, S., Zimmer, J., Oudin, A., Niclou, S.P., *et al.* (2013). Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 17450-17455.
15. Balsamo, M., Manzini, C., Pietra, G., Raggi, F., Blengio, F., Mingari, M.C., Varesio, L., Moretta, L., Bosco, M.C., and Vitale, M. (2013). Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC. *Eur J Immunol* *43*, 2756-2764.

16. Balsamo, M., Scordamaglia, F., Pietra, G., Manzini, C., Cantoni, C., Boitano, M., Queirolo, P., Vermi, W., Facchetti, F., Moretta, A., *et al.* (2009). Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 20847-20852.
17. Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A.M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* *28*, 5747-5763.
18. Barker, H.E., Bird, D., Lang, G., and Eler, J.T. (2013). Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. *Mol Cancer Res* *11*, 1425-1436.
19. Barsoum, I.B., Hamilton, T.K., Li, X., Cotecchini, T., Miles, E.A., Siemens, D.R., and Graham, C.H. (2011). Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide. *Cancer Res* *71*, 7433-7441.
20. Basanta, D., Strand, D.W., Lukner, R.B., Franco, O.E., Cliffl, D.E., Ayala, G.E., Hayward, S.W., and Anderson, A.R. (2009). The role of transforming growth factor-beta-mediated tumor-stroma interactions in prostate cancer progression: an integrative approach. *Cancer Res* *69*, 7111-7120.
21. Bedogni, B., and Powell, M.B. (2009). Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res* *22*, 166-174.
22. 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. *Mol Cell Biol* *29*, 2570-2581.
23. Benson, D.M., Jr., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., *et al.* (2010). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* *116*, 2286-2294.
24. Biassoni, R. (2008). Natural killer cell receptors. *Adv Exp Med Biol* *640*, 35-52.
25. Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* *196*, 254-265.
26. Biren Saraiya, J.A., Sujani Ganga Surakanti, Janice M. Mehnert, Eileen White, Robert S. DiPaola; (2014). K-ras mutation for prediction of response to chemotherapy plus autophagy inhibition in NSCLC. In ASCO 2014 (*J Clin Oncol* *32*, 2014 (suppl; abstr e19069)).
27. Boya, P. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol. Cell Biol.* *25*, 1025-1040.
28. Browne, K.A., Blink, E., Sutton, V.R., Froelich, C.J., Jans, D.A., and Trapani, J.A. (1999). Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol Cell Biol* *19*, 8604-8615.
29. Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K.P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L., and Lewis, C.E. (2003). Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* *163*, 1233-1243.
30. Butt, A.Q., and Mills, K.H. (2014). Immunosuppressive networks and checkpoints controlling antitumor immunity and their blockade in the development of cancer immunotherapeutics and vaccines. *Oncogene* *33*, 4623-4631.

31. Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249-257.
32. Cesen, M.H., Pegan, K., Spes, A., and Turk, B. (2012). Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res* *318*, 1245-1251.
33. Chalupny, N.J., Rein-Weston, A., Dosch, S., and Cosman, D. (2006). Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun* *346*, 175-181.
34. Champsaur, M., and Lanier, L.L. (2010). Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev* *235*, 267-285.
35. Chandran, P.A., Keller, A., Weinmann, L., Adel Seida, A., Braun, M., Andreev, K., Fischer, B., Horn, E., Schwinn, S., Junker, M., *et al.* (2014a). The TGF-beta-inducible miR-23a cluster attenuates IFN-gamma levels and antigen-specific cytotoxicity in human CD8+ T cells. *J Leukoc Biol* *96*, 633-645.
36. Chandran, P.A., Keller, A., Weinmann, L., Adel Seida, A., Braun, M., Andreev, K., Fischer, B., Horn, E., Schwinn, S., Junker, M., *et al.* (2014b). The TGF-beta-inducible miR-23a cluster attenuates IFN-gamma levels and antigen-specific cytotoxicity in human CD8+ T cells. *J Leukoc Biol*.
37. Chen, Y., De Marco, M.A., Graziani, I., Gazdar, A.F., Strack, P.R., Miele, L., and Bocchetta, M. (2007). Oxygen concentration determines the biological effects of NOTCH-1 signaling in adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* *67*, 7954-7959.
38. Cheng, L., Zhang, S., Eble, J.N., Beck, S.D., Foster, R.S., Wang, M., and Ulbright, T.M. (2012). Molecular genetic evidence supporting the neoplastic nature of fibrous stroma in testicular teratoma. *Mod Pathol* *25*, 1432-1438.
39. Chironi, G.N., Boulanger, C.M., Simon, A., Dignat-George, F., Freyssinet, J.M., and Tedgui, A. (2009). Endothelial microparticles in diseases. *Cell and tissue research* *335*, 143-151.
40. Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Linnane, S., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2008). Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* *180*, 7249-7258.
41. Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2007). Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res* *67*, 7458-7466.
42. Clayton, A., and Tabi, Z. (2005). Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. *Blood cells, molecules & diseases* *34*, 206-213.
43. Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.I., Cheng, P., Cho, H.I., Celis, E., Quiceno, D.G., Padhya, T., *et al.* (2010). HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* *207*, 2439-2453.
44. Crane, C.A., Han, S.J., Barry, J.J., Ahn, B.J., Lanier, L.L., and Parsa, A.T. (2010). TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro Oncol* *12*, 7-13.
45. Cummins, E.P., Berra, E., Comerford, K.M., Ginouves, A., Fitzgerald, K.T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J.E., Moynagh, P., Pouyssegur, J., *et al.* (2006). Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF $\kappa$ B activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 18154-18159.

46. D'Souza-Schorey, C., and Clancy, J.W. (2012). Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes & development* *26*, 1287-1299.
47. De Duve, C., De Reuck, A.V.S., Cameron, M.P., and Ciba Foundation. (1963). *Ciba Foundation Symposium: Lysosomes; [proceedings]* (Boston,: Little, Brown).
48. de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* *60*, 604-617.
49. de Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* *28*, 435-492.
50. DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* *7*, 11-20.
51. Del Conde, I., Shrimpton, C.N., Thiagarajan, P., and Lopez, J.A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* *106*, 1604-1611.
52. DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* *29*, 309-316.
53. Deng, B., Zhu, J.M., Wang, Y., Liu, T.T., Ding, Y.B., Xiao, W.M., Lu, G.T., Bo, P., and Shen, X.Z. (2013). Intratumor hypoxia promotes immune tolerance by inducing regulatory T cells via TGF-beta1 in gastric cancer. *PLoS one* *8*, e63777.
54. Devlin, C., Greco, S., Martelli, F., and Ivan, M. (2011). miR-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB Life* *63*, 94-100.
55. Dowdle, W.E., Nyfeler, B., Nagel, J., Elling, R.A., Liu, S., Triantafellow, E., Menon, S., Wang, Z., Honda, A., Pardee, G., *et al.* (2014). Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat Cell Biol* *16*, 1069-1079.
56. Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* *315*, 1650-1659.
57. Eken, C., Gasser, O., Zenhausern, G., Oehri, I., Hess, C., and Schifferli, J.A. (2008). Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* *180*, 817-824.
58. El-Andaloussi, S., Lee, Y., Lakhali-Littleton, S., Li, J., Seow, Y., Gardiner, C., Alvarez-Erviti, L., Sargent, I.L., and Wood, M.J. (2012). Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc* *7*, 2112-2126.
59. Elder, D.E. (2014). Pathological staging of melanoma. *Methods Mol Biol* *1102*, 325-351.
60. Elward, K., Griffiths, M., Mizuno, M., Harris, C.L., Neal, J.W., Morgan, B.P., and Gasque, P. (2005). CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J Biol Chem* *280*, 36342-36354.
61. Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., Taka, H., Fujimura, T., Takehana, K., Yoshida, M., *et al.* (2011). Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* *7*, 727-736.



62. Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* 92, 329-333.
63. Froelich, C.J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R., Babior, B., Shah, G.M., Bleackley, R.C., Dixit, V.M., and Hanna, W. (1996). New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem* 271, 29073-29079.
64. Fujita, M., Hayashi, I., Yamashina, S., Fukamizu, A., Itoman, M., and Majima, M. (2005). Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis* 26, 271-279.
65. Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., and Camussi, G. (2011). Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 26, 1474-1483.
66. Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., *et al.* (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202, 1075-1085.
67. Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., and Chiarugi, P. (2010). Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res* 70, 6945-6956.
68. Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 7, 1118-1122.
69. Gottardo, F., Liu, C.G., Ferracin, M., Calin, G.A., Fassan, M., Bassi, P., Sevignani, C., Byrne, D., Negrini, M., Pagano, F., *et al.* (2007). Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 25, 387-392.
70. Graff, S., Barach, A., Bickerman, H.A., Beck, G.J., Eisenberg, M., and Freedman, A.D. (1960). Hypoxia in cancer. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 16, 651-655.
71. Greenberg, E., Nemlich, Y., and Markel, G. (2014). MicroRNAs in Cancer: Lessons from Melanoma. *Current pharmaceutical design*.
72. Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
73. Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., and Lopez-Botet, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107, 3624-3631.
74. Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* 21, 309-322.
75. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
76. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
77. Hasmim, M., Messai, Y., Noman, M.Z., and Chouaib, S. (2014). [Tumor hypoxia: a key player in the regulation of stromal and anti-tumor responses]. *Med Sci (Paris)* 30, 422-428.
78. 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.

79. Hayashi, H., Inoue, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., and Onozaki, K. (2003). TGFbeta down-regulates IFN-gamma production in IL-18 treated NK cell line LNK5E6. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 980-985.
80. Heddleston, J.M., Li, Z., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 8, 3274-3284.
81. Hodge, G., Barnawi, J., Jurisevic, C., Moffat, D., Holmes, M., Reynolds, P.N., Jersmann, H., and Hodge, S. (2014). Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and IFNgamma by infiltrating lung tissue T cells, NKT-like and NK cells. *Clinical and experimental immunology*.
82. Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7987-7992.
83. Huang, S., He, X., Ding, J., Liang, L., Zhao, Y., Zhang, Z., Yao, X., Pan, Z., Zhang, P., Li, J., *et al.* (2008). Upregulation of miR-23a approximately 27a approximately 24 decreases transforming growth factor-beta-induced tumor-suppressive activities in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 123, 972-978.
84. Huang, X., Ding, L., Bennewith, K.L., Tong, R.T., Welford, S.M., Ang, K.K., Story, M., Le, Q.T., and Giaccia, A.J. (2009). Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell* 35, 856-867.
85. Hugel, B., Martinez, M.C., Kunzelmann, C., and Freyssinet, J.M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 20, 22-27.
86. Huntington, N.D., Vosshenrich, C.A., and Di Santo, J.P. (2007). Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* 7, 703-714.
87. Imielinski, M., Berger, A.H., Hammerman, P.S., Hernandez, B., Pugh, T.J., Hodis, E., Cho, J., Suh, J., Capelletti, M., Sivachenko, A., *et al.* (2012). Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell* 150, 1107-1120.
88. Jahid, S., Sun, J., Edwards, R.A., Dizon, D., Panarelli, N.C., Milsom, J.W., Sikandar, S.S., Gumus, Z.H., and Lipkin, S.M. (2012). miR-23a promotes the transition from indolent to invasive colorectal cancer. *Cancer Discov* 2, 540-553.
89. Janku, F., McConkey, D.J., Hong, D.S., and Kurzrock, R. (2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 528-539.
90. Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R., and Semenza, G.L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *The Journal of biological chemistry* 272, 19253-19260.
91. Jiang, J., Tang, Y.L., and Liang, X.H. (2011). EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol Ther* 11, 714-723.
92. Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537-548.
93. Jorfi, S., and Inal, J.M. (2013). The role of microvesicles in cancer progression and drug resistance. *Biochem Soc Trans* 41, 293-298.

94. Kaiser, B.K., Barahmand-Pour, F., Paulsene, W., Medley, S., Geraghty, D.E., and Strong, R.K. (2005). Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol* *174*, 2878-2884.
95. Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* *17*, 6573-6586.
96. Keith, B., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* *129*, 465-472.
97. Kim, H.W., Haider, H.K., Jiang, S., and Ashraf, M. (2009). Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. *J Biol Chem* *284*, 33161-33168.
98. Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., and Isaka, Y. (2013). Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* *73*, 3-7.
99. Klionsky, D.J. (2008). Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy* *4*, 740-743.
100. Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* *13*, 472-482.
101. Kulshreshtha, R., Davuluri, R.V., Calin, G.A., and Ivan, M. (2008). A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ* *15*, 667-671.
102. Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Negrini, M., Calin, G.A., Davuluri, R.V., and Ivan, M. (2007). Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. *Cell Cycle* *6*, 1426-1431.
103. Laconi, E. (2007). The evolving concept of tumor microenvironments. *Bioessays* *29*, 738-744.
104. Lee, C.T., Mace, T., and Repasky, E.A. (2010a). Hypoxia-driven immunosuppression: a new reason to use thermal therapy in the treatment of cancer? *Int J Hyperthermia* *26*, 232-246.
105. Lee, J.D., Hempel, N., Lee, N.Y., and Blobe, G.C. (2010b). The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression through GIPC-mediated inhibition of TGF-beta signaling. *Carcinogenesis* *31*, 175-183.
106. Lee, T.H., D'Asti, E., Magnus, N., Al-Nedawi, K., Meehan, B., and Rak, J. (2011). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol* *33*, 455-467.
107. Lee, Y., El Andaloussi, S., and Wood, M.J. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet* *21*, R125-134.
108. Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell* *6*, 463-477.
109. Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* *469*, 323-335.
110. Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* *182*, 240-249.
111. Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* *24*, 99-146.

112. Liu, Y., Zhao, L., Li, D., Yin, Y., Zhang, C.-Y., Li, J., and Zhang, Y. (2013). Microvesicle-delivery miR-150 promotes tumorigenesis by up-regulating VEGF, and the neutralization of miR-150 attenuate tumor development. *Protein Cell* *4*, 932-941.
113. Livesey, K.M., Tang, D., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2009). Autophagy inhibition in combination cancer treatment. *Curr Opin Investig Drugs* *10*, 1269-1279.
114. Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1965). PROGRAMMED CELL DEATH--I. CYTOLOGY OF DEGENERATION IN THE INTERSEGMENTAL MUSCLES OF THE PERNYI SILKMOTH. *J Insect Physiol* *11*, 123-133.
115. Lodoen, M.B., and Lanier, L.L. (2005). Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol* *3*, 59-69.
116. Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., and Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* *31*, 227-258.
117. Loscalzo, J. (2010). The cellular response to hypoxia: tuning the system with microRNAs. *J Clin Invest* *120*, 3815-3817.
118. Lv, L.H., Wan, Y.L., Lin, Y., Zhang, W., Yang, M., Li, G.L., Lin, H.M., Shang, C.Z., Chen, Y.J., and Min, J. (2012). Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *The Journal of biological chemistry* *287*, 15874-15885.
119. Mace, T.A., Yamane, N., Cheng, J., Hylander, B.L., and Repasky, E.A. (2006). The potential of the tumor microenvironment to influence Apo2L/TRAIL induced apoptosis. *Immunol Invest* *35*, 279-296.
120. Madanecki, P., Kapoor, N., Bebok, Z., Ochocka, R., Collawn, J.F., and Bartoszewski, R. (2013). Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of microRNA. *Cell Mol Biol Lett* *18*, 47-57.
121. Maeda, N., Yoshimura, K., Yamamoto, S., Kuramasu, A., Inoue, M., Suzuki, N., Watanabe, Y., Maeda, Y., Kamei, R., Tsunedomi, R., *et al.* (2014). Expression of B7-H3, a Potential Factor of Tumor Immune Evasion in Combination with the Number of Regulatory T Cells, Affects Against Recurrence-Free Survival in Breast Cancer Patients. *Annals of surgical oncology*.
122. Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* *3*, 374-376.
123. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436-444.
124. Martins, V.R., Dias, M.S., and Hainaut, P. (2013). Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. *Current opinion in oncology* *25*, 66-75.
125. Mathew, R. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* *21*, 1367-1381.
126. Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* *7*, 961-967.
127. Mazure, N.M., and Pouyssegur, J. (2010). Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol* *22*, 177-180.

128. Mei, Z., Liu, Y., Liu, C., Cui, A., Liang, Z., Wang, G., Peng, H., Cui, L., and Li, C. (2014). Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* *110*, 1595-1605.
129. Melichar, B., Studentova, H., Kalabova, H., Vitaskova, D., Cermakova, P., Hornychova, H., and Ryska, A. (2014). Predictive and prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer treated with neoadjuvant systemic therapy. *Anticancer Res* *34*, 1115-1125.
130. 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.
131. Mitra, A.K., Zillhardt, M., Hua, Y., Tiwari, P., Murmann, A.E., Peter, M.E., and Lengyel, E. (2012). MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. *Cancer Discov* *2*, 1100-1108.
132. Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* *27*, 421-429.
133. Moretta, A., Locatelli, F., and Moretta, L. (2008). Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev* *224*, 58-69.
134. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J.W., Sedgwick, A., and D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of cell science* *123*, 1603-1611.
135. Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C.E. (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* *104*, 2224-2234.
136. Muturi, H.T., Dreesen, J.D., Nilewski, E., Jastrow, H., Giebel, B., Ergun, S., and Singer, B.B. (2013). Tumor and Endothelial Cell-Derived Microvesicles Carry Distinct CEACAMs and Influence T-Cell Behavior. *PLoS ONE* *8*, e74654.
137. Nagasawa, H., Uto, Y., Kirk, K.L., and Hori, H. (2006). Design of hypoxia-targeting drugs as new cancer chemotherapeutics. *Biol Pharm Bull* *29*, 2335-2342.
138. Neal, J.W. (2014). A multicenter randomized phase II trial of erlotinib with and without hydroxychloroquine (HCQ) in TKI-naive patients (pts) with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutant advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). In *ASCO 2014 (J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr TPS2640))*.
139. Neth, P., Ries, C., Karow, M., Egea, V., Ilmer, M., and Jochum, M. (2007). The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev* *3*, 18-29.
140. Nielsen, N., Odum, N., Urso, B., Lanier, L.L., and Spee, P. (2012). Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A. *PLoS One* *7*, e31959.
141. Noman, M.Z., Buart, S., Romero, P., Ketari, S., Janji, B., Mari, B., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2012). Hypoxia-inducible miR-210 regulates the susceptibility of tumor cells to lysis by cytotoxic T cells. *Cancer research* *72*, 4629-4641.
142. Noman, M.Z., Buart, S., Van Pelt, J., Richon, C., Hasmim, M., Leleu, N., Suchorska, W.M., Jalil, A., Lecluse, Y., El Hage, F., *et al.* (2009). 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.

143. Noman, M.Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., and Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *The Journal of experimental medicine* *211*, 781-790.
144. 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 Res* *71*, 5976-5986.
145. Ogier-Denis, E., and Codogno, P. (2003). Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et biophysica acta* *1603*, 113-128.
146. Ohno, S., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., *et al.* (2013). Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther* *21*, 185-191.
147. Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 211-216.
148. Olson, S.D., Kambal, A., Pollock, K., Mitchell, G.M., Stewart, H., Kalomoiris, S., Cary, W., Nacey, C., Pepper, K., and Nolte, J.A. (2012). Examination of mesenchymal stem cell-mediated RNAi transfer to Huntington's disease affected neuronal cells for reduction of huntingtin. *Mol Cell Neurosci* *49*, 271-281.
149. Orange, J.S., and Ballas, Z.K. (2006). Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* *118*, 1-10.
150. Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., and Fridman, W.H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* *29*, 1093-1102.
151. Pan, Q., Ramakrishnaiah, V., Henry, S., Fouraschen, S., de Ruiter, P.E., Kwekkeboom, J., Tilanus, H.W., Janssen, H.L., and van der Laan, L.J. (2012). Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi). *Gut* *61*, 1330-1339.
152. Pardal, R., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* *3*, 895-902.
153. Paust, S., Senman, B., and von Andrian, U.H. (2010). Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev* *235*, 286-296.
154. Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., *et al.* (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* *18*, 883-891.
155. Pietras, K., and Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* *316*, 1324-1331.
156. Pua, H.H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N., and He, Y.W. (2007). A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med* *204*, 25-31.
157. Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* *141*, 39-51.

158. Quintero, M., Mackenzie, N., and Brennan, P.A. (2004). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol* *30*, 465-468.
159. Rak, J., and Guha, A. (2012). Extracellular vesicles--vehicles that spread cancer genes. *Bioessays* *34*, 489-497.
160. Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* *183*, 1161-1172.
161. Rappa, G., Mercapide, J., and Lorico, A. (2012). Spontaneous formation of tumorigenic hybrids between breast cancer and multipotent stromal cells is a source of tumor heterogeneity. *Am J Pathol* *180*, 2504-2515.
162. Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* *20*, 1487-1495.
163. Raulet, D.H., and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* *6*, 520-531.
164. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105-111.
165. Riley-Vargas, R.C., Gill, D.B., Kemper, C., Liszewski, M.K., and Atkinson, J.P. (2004). CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol* *25*, 496-503.
166. Rockwell, S. (1992). Use of hypoxia-directed drugs in the therapy of solid tumors. *Semin Oncol* *19*, 29-40.
167. Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., *et al.* (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* *120*, 127-141.
168. Rubinsztein, D.C., Codogno, P., and Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* *11*, 709-730.
169. Safaei, R., Larson, B.J., Cheng, T.C., Gibson, M.A., Otani, S., Naerdemann, W., and Howell, S.B. (2005). Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* *4*, 1595-1604.
170. Sarkar, A., Mitra, S., Mehta, S., Raices, R., and Wewers, M.D. (2009). Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS One* *4*, e7140.
171. Saumet, A., Vetter, G., Bouttier, M., Portales-Casamar, E., Wasserman, W.W., Maurin, T., Mari, B., Barbry, P., Vallar, L., Friederich, E., *et al.* (2009). Transcriptional repression of microRNA genes by PML-RARA increases expression of key cancer proteins in acute promyelocytic leukemia. *Blood* *113*, 412-421.
172. Schatton, T., Scolyer, R.A., Thompson, J.F., and Mihm, M.C., Jr. (2014). Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. *Methods in molecular biology* *1102*, 287-324.
173. Schifferli, J.A. (2011). Microvesicles are messengers. *Seminars in immunopathology* *33*, 393-394.
174. Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 343-354.

175. Schweichel, J.U., and Merker, H.J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-266.
176. Semenza, G.L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 588-594.
177. Semenza, G.L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest* 118, 3835-3837.
178. Semenza, G.L. (2009). HIF-1 inhibitors for cancer therapy: from gene expression to drug discovery. *Curr Pharm Des* 15, 3839-3843.
179. Semenza, G.L. (2010a). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625-634.
180. Semenza, G.L. (2010b). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20, 51-56.
181. Senovilla, L., Vacchelli, E., Galon, J., Adjemian, S., Eggermont, A., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., Ma, Y., Tartour, E., Zitvogel, L., *et al.* (2012). Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology* 1, 1323-1343.
182. Shedden, K., Townsend, L.B., Drach, J.C., and Rosania, G.R. (2003). A rational approach to personalized anticancer therapy: chemoinformatic analysis reveals mechanistic gene-drug associations. *Pharm Res* 20, 843-847.
183. Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M.G., Rimoldi, M., Biswas, S.K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18, 349-355.
184. Sidhu, S.S., Mengistab, A.T., Tauscher, A.N., LaVail, J., and Basbaum, C. (2004). The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene* 23, 956-963.
185. Siemens, D.R., Hu, N., Sheikhi, A.K., Chung, E., Frederiksen, L.J., Pross, H., and Graham, C.H. (2008). Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide. *Cancer Res* 68, 4746-4753.
186. Sims, P.J., Faioni, E.M., Wiedmer, T., and Shattil, S.J. (1988). Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 263, 18205-18212.
187. Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* 179, 977-983.
188. Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10, 1470-1476.
189. Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 850-861.
190. Soliman, H., Khalil, F., and Antonia, S. (2014). PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PloS one* 9, e88557.



191. Stern-Ginossar, N., Gur, C., Biton, M., Horwitz, E., Elboim, M., Stanietsky, N., Mandelboim, M., and Mandelboim, O. (2008). Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol* 9, 1065-1073.
192. Szajnik, M., Czystowska, M., Szczepanski, M.J., Mandapathil, M., and Whiteside, T.L. (2010). Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS one* 5, e11469.
193. Szczepanski, M.J., Szajnik, M., Welsh, A., Whiteside, T.L., and Boyiadzis, M. (2011). Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1. *Haematologica* 96, 1302-1309.
194. Tartour, E., Pere, H., Maillere, B., Terme, M., Merillon, N., Taieb, J., Sandoval, F., Quintin-Colonna, F., Lacerda, K., Karadimou, A., *et al.* (2011). Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer metastasis reviews* 30, 83-95.
195. Tesselaar, M.E., and Osanto, S. (2007). Risk of venous thromboembolism in lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 13, 362-367.
196. Thomas, D.A., and Massague, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell* 8, 369-380.
197. Timonen, T., Ortaldo, J.R., and Herberman, R.B. (1981). Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 153, 569-582.
198. Tsukerman, P., Stern-Ginossar, N., Gur, C., Glasner, A., Nachmani, D., Bauman, Y., Yamin, R., Vitenshtein, A., Stanietsky, N., Bar-Mag, T., *et al.* (2012). MiR-10b downregulates the stress-induced cell surface molecule MICB, a critical ligand for cancer cell recognition by natural killer cells. *Cancer Res* 72, 5463-5472.
199. Vitale, M., Cantoni, C., Pietra, G., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2014). Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *European journal of immunology* 44, 1582-1592.
200. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature immunology* 9, 503-510.
201. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 12, 239-252.
202. Walzer, T., Dalod, M., Vivier, E., and Zitvogel, L. (2005). Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1, S49-59.
203. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5510-5514.
204. Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* 270, 1230-1237.
205. Wang, R.F., Zhang, L.H., Shan, L.H., Sun, W.G., Chai, C.C., Wu, H.M., Ibla, J.C., Wang, L.F., and Liu, J.R. (2013). Effects of the fibroblast activation protein on the invasion and migration of gastric cancer. *Exp Mol Pathol* 95, 350-356.
206. Wang, T., Gilkes, D.M., Takano, N., Xiang, L., Luo, W., Bishop, C.J., Chaturvedi, P., Green, J.J., and Semenza, G.L. (2014). Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of

- microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
207. 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.
  208. Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* *123*, 309-314.
  209. Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E. (1924). Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochemische Zeitschrift* *152*, 319-344.
  210. Webb, S.D., Owen, M.R., Byrne, H.M., Murdoch, C., and Lewis, C.E. (2007). Macrophage-based anti-cancer therapy: modelling different modes of tumour targeting. *Bull Math Biol* *69*, 1747-1776.
  211. West, N.R., Milne, K., Truong, P.T., Macpherson, N., Nelson, B.H., and Watson, P.H. (2011). Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* *13*, R126.
  212. Whiteside, T.L. (2013). Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochemical Society transactions* *41*, 245-251.
  213. Wiener, C.M., Booth, G., and Semenza, G.L. (1996). In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical and biophysical research communications* *225*, 485-488.
  214. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., *et al.* (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature medicine* *7*, 297-303.
  215. Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B., Su, F., Lin, L., Liu, Y., Huang, J.D., and Song, E. (2011a). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Molecular cancer* *10*, 117.
  216. Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* *22*, 124-131.
  217. Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S., and Sinicrope, F.A. (2011b). The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* *10*, 1533-1541.
  218. Young, J.D., Hengartner, H., Podack, E.R., and Cohn, Z.A. (1986). Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* *44*, 849-859.
  219. Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H.U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature cell biology* *8*, 1124-1132.
  220. Yu, H., Kortylewski, M., and Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* *7*, 41-51.
  221. Zavadil, J., and Bottinger, E.P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* *24*, 5764-5774.
  222. Zhang, F.F., Zhu, Y.F., Zhao, Q.N., Yang, D.T., Dong, Y.P., Jiang, L., Xing, W.X., Li, X.Y., Xing, H., Shi, M., *et al.* (2014). Microvesicles mediate transfer of P-glycoprotein to paclitaxel-sensitive A2780 human ovarian cancer cells, conferring paclitaxel-resistance. *Eur J Pharmacol* *738c*, 83-90.

223. Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., *et al.* (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 39, 133-144.
224. Zhong, Z., Carroll, K.D., Policarpio, D., Osborn, C., Gregory, M., Bassi, R., Jimenez, X., Prewett, M., Liebisch, G., Persaud, K., *et al.* (2010). Anti-transforming growth factor beta receptor II antibody has therapeutic efficacy against primary tumor growth and metastasis through multieffects on cancer, stroma, and immune cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 1191-1205.
225. Zhu, L.H., Liu, T., Tang, H., Tian, R.Q., Su, C., Liu, M., and Li, X. (2010). MicroRNA-23a promotes the growth of gastric adenocarcinoma cell line MGC803 and downregulates interleukin-6 receptor. *Febs j* 277, 3726-3734.
226. Zimmer, J. (2010). *Natural killer cells : at the forefront of modern immunology* (Berlin: Springer).
227. Zingoni, A., Sornasse, T., Cocks, B.G., Tanaka, Y., Santoni, A., and Lanier, L.L. (2004). Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 173, 3716-3724.

## Résumé

---

Le microenvironnement tumoral, et notamment le stress hypoxique, joue un rôle immunosuppresseur permettant l'échappement des cellules tumorales à la surveillance du système immunitaire. Des études récentes ont montré que l'échange de microvésicules (MVs) entre les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire peut être responsable de l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur. Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet des MVs issues des cellules tumorales hypoxiques sur la cytotoxicité des cellules «Natural Killer» (NKs). Nos résultats démontrent clairement que les cellules NKs sont capables d'internaliser les MVs issues des cellules tumorales normoxiques et hypoxiques. Cependant, seules les MVs hypoxiques sont capables de diminuer significativement la cytotoxicité des cellules NKs. Ainsi, nous avons déterminé que les MVs dérivées des cellules tumorales hypoxiques séquestrent deux immunomodulateurs, le TGF- $\beta$  et le miR-23a. Nous avons montré que le transfert de TGF- $\beta$  et miR-23a aux cellules NKs était responsable de la diminution respective de l'expression du récepteur activateur NKG2D à leur surface et de la protéine membranaire associée aux lysosomes (LAMP-1/CD107a) impliquée dans la dégranulation des granules cytotoxiques.

Dans la deuxième partie de cette étude nous avons montré que les cellules tumorales soumises à un stress hypoxique étaient capables de déjouer un système immunitaire fonctionnel et d'échapper ainsi à la surveillance immunitaire des cellules NKs. En effet, nos résultats ont clairement démontré que la résistance des cellules tumorales hypoxiques à la lyse par les cellules NKs n'était pas liée à un défaut de reconnaissance, mais plutôt à l'activation d'un mécanisme de résistance intrinsèque dans les cellules tumorales. Ce mécanisme de résistance implique l'activation de l'autophagie qui opère dans les cellules tumorales pour dégrader le granzyme B, une protéase à sérine sécrétée par les cellules NKs dont l'internalisation par les cellules tumorales cibles est nécessaire pour induire leur mort. Les expériences d'imagerie cellulaire combinées à des approches biochimiques ont confirmé que le niveau de granzyme B dans les cellules tumorales hypoxiques était significativement moins élevé par rapport à celui des cellules tumorales normoxiques. L'analyse de la distribution subcellulaire de granzyme B révèle qu'il est majoritairement présent dans les endosomes et les autophagosomes des cellules tumorales hypoxiques. Ces résultats suggèrent fortement que le granzyme B est destiné à être dégradé par autophagie dans les cellules tumorales hypoxiques. En effet, l'inhibition génétique et pharmacologique de l'autophagie dans les cellules tumorales hypoxiques était suffisante pour contrecarrer la dégradation de granzyme B et ainsi restaurer la sensibilité des cellules tumorales hypoxiques à la lyse par les cellules NKs. Nos résultats ont clairement établi que l'inhibition de l'autophagie pouvait améliorer la réponse immunitaire antitumorale dépendante des cellules NK. Nous avons validé ce concept *in vivo* chez la souris en utilisant deux modèles syngéniques de cancer du sein et de mélanome.

L'ensemble de nos travaux indiquent clairement que le stress hypoxique, qui est une caractéristique majeure du microenvironnement tumoral, peut favoriser l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur par plusieurs mécanismes qui ne s'excluent pas mutuellement. En effet, le stress hypoxique modifie les caractéristiques des cellules tumorales et active des mécanismes de résistance à la surveillance immunitaire. De plus, les cellules tumorales modifiées peuvent éduquer et exporter leur phénotype hypoxique aux cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement afin d'affaiblir leur pouvoir cytotoxique. Nos résultats ouvrent ainsi la voie à la mise en place de nouvelles applications cliniques en immunothérapie anticancéreuse basées sur la réactivation des lymphocytes cytotoxiques et l'inhibition simultanée de l'autophagie.