



# La transition épithélio-mésenchymateuse régule l'expression de PD-L1 dans le cancer du poumon, non à petites cellules : un rôle pour IKK

Afag Asgarova

## ► To cite this version:

Afag Asgarova. La transition épithélio-mésenchymateuse régule l'expression de PD-L1 dans le cancer du poumon, non à petites cellules : un rôle pour IKK . Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2015. Français. NNT : 2015BESA3007 . tel-01320989

**HAL Id: tel-01320989**

<https://theses.hal.science/tel-01320989>

Submitted on 24 May 2016

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

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

*La transition épithélio-mésenchymateuse régule l'expression de PD-L1 dans le cancer du poumon non à petites cellules: un rôle pour IKK $\epsilon$ .*



**UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE**

**UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES DE  
BESANCON**

**Année Universitaire 2014-2015**

**THESE**

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat de l'Université de Franche-Comté  
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Afag ASGAROVA**

*Le 2 octobre 2015*

***La transition épithélio-mésenchymateuse régule  
l'expression de PD-L1 dans le cancer du poumon non à  
petites cellules: un rôle pour IKK $\epsilon$ .***

**Sous la direction du Professeur Christophe BORG**

Membres du Jury :

Directeur de thèse : Professeur Christophe BORG, Université de Besançon.

Examinateur : Docteur Eric HERVOUET, Université de Besançon.

Rapporteur : Professeur Philippe BIREMBAUT, Université de Reims.

Rapporteur : Docteur Cecile ROCHELLE-EGLY, Université de Strasbourg.



# PREAMBULE

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un facteur de mauvais pronostic qui désigne le passage d'un groupe de cellules épithéliales à une forme mésenchymateuse. Les cellules cancéreuses qui subissent la TEM deviennent plus agressives, donnent des métastases et développent des mécanismes pour mieux échapper à l'apoptose et au système immunitaire. Les nombreuses études immunohistochimiques sur des biopsies de tumeurs ont montré que la TEM est corrélée à l'invasivité tumorale, à la présence de métastases, et à la mortalité des patients (*Birchmeier and Behrens, 1994*)(*Mareel et al., 1994*).

L'introduction de cette thèse nous permettra dans un premier temps de revenir sur les étapes principales de l'oncogenèse et le rôle de la TEM dans ce processus. Ensuite nous décrirons les étapes successives de la TEM et notamment les différents facteurs de transcription et les voies de signalisation impliquées dans la TEM. Dans un deuxième temps, nous aborderons le sujet de la communication entre les cellules cancéreuses et les cellules du système immunitaire. Dans cette partie, nous illustrerons les mécanismes moléculaires conduisant à l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire et décrirons les différentes molécules de point de contrôle immunologique. Enfin, nous allons évoquer les différentes voies de signalisation régulant l'expression de ces molécules, en s'intéressant tout particulièrement à PD-L1.

Dans la partie résultats de cette thèse, nous allons tout d'abord induire la TEM par stimulation avec les cytokines TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$  sur la lignée du cancer du poumon A549. Nous verrons ensuite comment cette lignée devenant mésenchymateuse transmet un signal d'inhibition pour bloquer l'immunité.

Enfin, nous aborderons les perspectives de ce projet en discutant les résultats obtenus.

# SOMMAIRE

<i>PREAMBULE</i> .....	5
<i>SOMMAIRE</i> .....	6
<i>LISTE DES FIGURES</i> .....	10
<i>LES ABREVIATIONS</i> .....	13
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>27</b>
I. ONCOGENESE ET TEM .....	29
1. ONCOGENESE.....	29
A) Les principales étapes de l'oncogenèse .....	29
Promotion et hétérogénéité tumorale .....	31
B) Proto-oncogènes et anti-oncogènes .....	32
Identification des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs : .....	32
2. TEM.....	35
A) L'adhésion cellulaire .....	35
B) Les étapes principales de la TEM.....	37
C) Biomarqueurs de la TEM .....	38
Switch des cadhérines pendant la TEM .....	39
Les cadhérines sont réprimées pendant la TEM .....	39
Les cadhérines surexprimées pendant la TEM .....	41
Le phénotype CSCs .....	41
C) Les types de TEM .....	42
TEM physiologique.....	42
TEM de type 1 (Embryogenèse) .....	42

TEM de type 2 (Cicatrisation).....	43
TEM pathologique .....	43
TEM de type 2 (Fibroses) .....	43
TEM de type 3 (Tumorigenèse).....	43
II. PROCESSUS CELLULAIRE CONDUISANT A LA TEM .....	46
A.LES ACTIVATEURS DE LA TEM .....	46
TGF- $\beta$ .....	46
VEGF .....	53
TNF- $\alpha$ .....	54
ICAM-1 .....	55
B. LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES EN TEM .....	59
Notch .....	59
Wnt.....	60
Akt .....	60
C. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUES EN TEM.....	61
Zeb.....	61
Twist.....	63
Snail .....	65
Elf5 .....	70
SIRT1 .....	70
Sox4.....	70
D. REGULATIONS EPIGENETIQUES DANS LA TEM .....	72
Les principaux modes de régulations épigénétiques .....	72
a)Les modifications post-traductionnelles des histones .....	73
b)La méthylation de l'ADN.....	75
c)Les petits ARN .....	75
III. L'IMMORTALISATION DES CELLULES CANCEREUSES .....	76

A) Activation de la télomérase.....	76
Télomérase .....	76
B) Perte de la sénescence.....	77
Sénescence.....	77
C) Inactivation de p53. ....	80
p53 .....	80
Régulation de p53:.....	81
p53 et apoptose:.....	81
p53 comme gardien du génome :.....	83
p53 dans la TEM :.....	85
Les homologues de p53 : .....	87
3. IMMUNOSURVEILLANCE ET EVASION TUMORALE .....	89
Echappement aux cellules immunitaires/PD-L1.....	90
PD-L1 (B7-H1).....	94
Mécanismes d'induction et régulation dynamique de PD-L1.....	97
Ciblage des inhibiteurs des points de contrôles immunologiques dans la thérapie des cancers. ....	101
IV. LES VOIES IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DE PD-L1 .....	103
NUCLEAR FACTOR-KAPPA B .....	103
Structure de NF-κB.....	103
Régulation de NF-κB :.....	105
Interactions de NF-κB avec d'autres voies de signalisation :.....	109
Principales fonctions de NF-κB: .....	111
IKK $\epsilon$ .....	113
Structure d'IKK $\epsilon$ .....	113
Régulation et fonction d'IKK $\epsilon$ .....	116
Implication d'IKK $\epsilon$ dans l'activation de NF-κB.....	118
Implication d'IKK $\epsilon$ dans l'activation des STATs .....	119

Implication d'IKK $\epsilon$ dans l'activation des IRFs .....	120
Implication d'IKK $\epsilon$ dans l'inactivation de FOXO3 .....	121
Rôle d'IKK $\epsilon$ en cancérologie.....	124
Fonctions dans l'apoptose : .....	124
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>126</b>
<b>INTRODUCTION A LA PUBLICATION .....</b>	<b>128</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>131</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>165</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>175</b>
<b>LES LIENS .....</b>	<b>213</b>

# LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Le cancer est une maladie dont l'évolution est clonale.</i>	31
<i>Figure 2 : Les étapes principales de la TEM.</i>	38
<i>Figure 3 : Participation des différents répresseurs d'E-cadhéchine pendant l'invasion tumorale.</i>	40
<i>Figure 4 : Différents types de TEM.</i>	44
<i>Figure 5 : TEM induite par TGF- <math>\beta</math>.</i>	50
<i>Figure 6 : La migration trans-endothéliale des cellules tumorales.</i>	58
<i>Figure 7 : Mécanismes de régulation épigénétique.</i>	73
<i>Figure 8 : SASP peut favoriser un phénotype malin et la croissance tumorale.</i>	78
<i>Figure 9 : Diverses classes de sénescence.</i>	79
<i>Figure 10 : Interactions et diversités des voies de signalisation de l'apoptose.</i>	84
<i>Figure 11 : p53 empêche l'induction de la TEM via divers miRs.</i>	87
<i>Figure 12 : Interactions entre le système immunitaire et le cancer.</i>	89
<i>Figure 13 : Les mécanismes majeurs de l'évasion tumorale.</i>	91
<i>Figure 14 : Les interactions co-inhibitrices et co-stimulatrices de la synapse immunologique.</i>	93
<i>Figure 15 : Mécanismes d'action de PD-1, PD-L1 et de PD-L2.</i>	97
<i>Figure 16 : Comparaison de la réponse immunitaire classique dirigée contre les antigènes tumorales par rapport à l'évasion immunitaire des cellules tumorales médiées par PD-L1.</i>	99
<i>Figure 17 : Régulation de PD-L1.</i>	100
<i>Figure 18 : Les différents domaines des unités de la voie NF-<math>\kappa</math>B.</i>	104
<i>Figure 19 : Les voies de signalisation de NF-<math>\kappa</math>B.</i>	106
<i>Figure 20 : Modifications post-traductionnelles de RelA, I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> et I<math>\kappa</math>B<math>\beta</math>.</i>	107
<i>Figure 21 : L'interaction entre la voie canonique de NF-<math>\kappa</math>B et différents processus de signalisation.</i>	110
<i>Figure 22 : Les gènes NF-<math>\kappa</math>B dépendants.</i>	112

<i>Figure 23 : Séquence nucléotidique représentant le promoteur et la 5'UTR (Un Translated Region) du gène IKK<math>\epsilon</math> humain.</i>	114
<i>Figure 24 : Alignement des séquences polypeptidiques d'IKK<math>\alpha</math>, IKK<math>\beta</math> et IKK<math>\epsilon</math>.</i>	115
<i>Figure 25 : Structure 3D d'IKK<math>\epsilon</math>.</i>	116
<i>Figure 26 : Interactions possibles avec IKK<math>\epsilon</math>.</i>	118
<i>Figure 27 : Régulation et fonctions d'IKK<math>\epsilon</math>.</i>	123
<i>Figure 28: L'INF- <math>\gamma</math> induit l'expression de PD-L1.</i>	170
<i>Figure 29: E-cadhérine empêche l'induction de PD-L1.</i>	170
<i>Figure 30: Le TGF- <math>\beta</math> est préliminaire dans la régulation de PD-L1.</i>	171
<i>Figure 31: L'augmentation de l'expression d'ICAM-1 avec le TNF- <math>\alpha</math>.</i>	172
<i>Figure 32: La TEM n'induit par l'expression des STATs.</i>	173

# LISTE DES TABLEAUX

*Tableau 1 : Principaux FT de la TEM et leurs cibles.....* 69

*Tableau 2 : Expression de PD-L1 dans divers cancers.....* 95

# LES ABREVIATIONS

## A

---

A2aR : Adenosine A2a receptor

Akt: Protein kinase B

AngII : Angiotensin

ANK : Ankryrin repetition domain

AP-1 : Activator protein-1

APC : Antigen Presentating Cell

APC/C-CDH1 : CDH1-containing anaphase-promoting complex

ARNdb : Double stranded RNA

ATM : Ataxia telangiectasia mutated

α-SMA : Alpha-smooth muscle actin

## B

---

B7RP1 : B7-related protein 1

BAFFR : B-cell activating receptor

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large

bHLH : Basic helip-loop-helix family

BIRC : Baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat- containing proteins

BMP-7 : Bone morphogenetic protein

BTLA : B and T lymphocyte attenuator, connu comme CD272

## C

---

CAC : Colitis-associated carcinogenesis

CARD : Caspase recrutement domain

CC : Coiled-coil domain

CCL5 : Chemokine (C-C motif) ligand 5

cDCs: Conventional Dendritic Cells

CK1e : Casein kinase 1

CLDN7 : Claudin-7

CMH-I : Major histocompatibility complex

COX2 : Cyclooxygenase-2

CpG : C—phosphate—G

CSCs : Cancer stem cells

CtBP : C-terminal-binding protein

CTCs : Ciculating tumor cells

CTL : Cytotoxic T lymphocytes

CTLA4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen 4

CXCL12 : Chemokine ligand

CXCR4 : Chemokine C-X-C motif receptor

CYLD : Cylidromatosis

## D

---

DAAM1 : Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1

DC : Dendritic cells

DD : Death domain

DDR : DNA damage réponse

DDX3 : DEAD box protein 3

DDX58 : DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58

DNMT : DNA methyltransferase

DSH : Dishevelled

## E

---

E-cadhéchine : Epithelial-cadherin

Elf5 : E74-like factor 5

ERG : *ETS-related gene*

ERK : Extracellular Signal-Related Kinase

Ets : E twenty-six domain transcription factor

ETS : Erythroblast transformation- specific

Ezh2 : Enhancer of zeste homolog 2

## F

---

FasL : Fas ligand

FBXL11 : F-box and leucin-rich repeat protein

FBXL14 : F-box and leucine-rich repeat protein 14

Fc : Fragment crystallisable

FOXA1 : Forkhead box A1

Fz : Frizzled

## **G**

---

GAF : Gamma-activated complex

GAL9 : Galectine 9

GRH-2 : Grainyhead -like 2

GRO : Growth- related oncogene

GSC : Goosecoid

GSK3 : Glycogen synthétase kinase 3

## **H**

---

H3K27Me3 : Tri-methylation of lysine 27 on histone H3

H3K4m2 : Histone 3 lysine 4 dimethylation

HDAC : Histone deacetylase

HEp2 : Human epidermoid cancer cells

HFA-1a : Hypoxia-inducible factor 1a

HGF : Hepatocyte growth factor

HIF-1 $\alpha$  : Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HLA-G : Human Leukocyte Antigen G

HLH : Helix loop helix

HMGA2 : High mobility group AT-hook 2

HMGB1 : High-mobility group box 1 protein

HTLV-1 : Human T lymphotrophic virus-1

HVEM : Herpesvirus entry mediator

---

I

---

ICAM-1 : InterCellular adhesion molecule

ICOS : Inducible T cell co-stimulator

IECS : Intestinal epithelial cells

IFN- $\gamma$  : Interferon gamma

IkB : Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor

IKK : IkB kinase

IKK $\epsilon$  : I-kappa-B kinase epsilon

IL- 1RAcP : Interleukin-1 Receptor Accessory Protein

IPS1 : IFN- $\beta$  promoter stimulator 1

irAEs (EILI) : Immune-related adverse events (effets indésirables liés à l'immunité)

IRAK : Interleukin-1 receptor-associated kinase

IRF : Interferon Regulatory Factor

ISGF3 : IFN-stimulated gene factor 3

ISRE : Interferon-stimulated response element

---

J

---

JAK : Janus kinase

JNKs : c-JUN N-terminal kinases

---

## K

KD : Kinase domain

KIR : Killer cell immunoglobulin- like receptor

KIRs : Killer-cell immunoglobulin-like receptors

KLF4 : Kruppel-like factor 4

KLRG1 : Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1

KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

KRT 8 : Cytokeratin-8

---

## L

LAG3 : Lymphocyte activation gene 3 protein

LEF-1 : Lymphoid enhancer-binding factor 1

Let-7 : Lethal-7

LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1

LOX : Lysyl oxidase

LOXL2 : Lysyl oxidase-like 2

LOXL3 : Lysyl oxidase-like 3

LPS : Lipopolysaccharide

LRP-5/6 : lipoprotein receptor-related proteins 5/6

LSD1 : Lysine-specific demethylase 1

LT : Lymphocyte T

LTBR : Lymphotoxin-B receptor

LTh : Lymphocytes T helper

LZ : Leucin-ziper-like-motif

## **M**

---

Mac-1 : Macrophage adhesion ligand-1

MAP3K7 : Mitogen-Activated Type 3-Protein Kinase 7

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MaSCs : Mammary stem cells

MAVS : Mitochondrial antiviral-signaling protein

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog

MDSC : Myeloid-derived suppressor cells

MET : Mesenchymal- epithelial transition

MICA : MHC class I polypeptide-related sequence A

MICB : MHC class I polypeptide-related sequence B

MiR : Micro RNA

MM : Multiple myeloma

MMP : Matrix metalloproteinase

MoDCs : Monocyte- derived Dendritic Cells

Msk-1 : Mitogen and stress activated protein kinase-1

mTOR : Mammalian target of rapamycin

MUC-1 : Mucin-1

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

---

## N

NAP1=AZI2 : 5-azacytidine-induced protein 2

NAT : Natural antisense transcript

NBD: Nemo binding domain

NEMO : NF-κB essential modifier

NES : Nuclear export sequence

NF-κB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NIK : NF-κB-inducing kinase

NK : Natural killer

NK-ADCC : NK cell mediated-antibody dependent cell cytotoxicity

NKG2D : Natural killer group 2D

NLS : Nuclear localization sequence

NSCLC : Non-small-cell lung carcinoma

NSD1 : Nuclear receptor binding SET domain protein 1

NURD : Nucleosome Remodeling Deacetylase

---

## O

OIS : Oncogene-induced senescence

ORR : Objective response rate

OS : Overall survival

**P**

---

PCAF : P300/CBP associated factor

PD-1 : Programmed cell death protein 1

PD-1 : Programmed death- 1

PD-L1 : Programmed cell death protein 1 ligand 1

PD-L2 : Programmed cell death protein 1 ligand 2

PEST : Proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)

PFS : Progression free survival

PFT- $\alpha$  : Pifithrin  $\alpha$

PGE2 : Prostaglandin E2

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PICS : PTEN loss-induced cellular senescence

PKA : Protein kinase A

PKB : Protein kinase B

PKC : Protein kinase C

PKR : Protein kinase R

PMA : Phorbol ester

PMNs : Polymorphonuclear neutrophils

PP2A : Protein phosphatase 2

PtdSer : Phosphatidylserine

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

pTreg : Treg périphérique

Pyk2 : Proline-rich tyrosine kinase 2

## R

---

Ral-GEF : Ral-guanine nucleotide exchange factor

RANK : Receptor Activator of Nuclear Factor κ B

RANTES : Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

RHD : Rel-homology domain

RIG-I : Retinoic acid inducible gene 1

RLRS : RIG-I-like receptor

ROCK : Rho-associated kinase

RSK1 : Ribosomal sub-unit kinase-1

RSV : Respiratory Syncytial Virus

## S

---

S : Serine

S6K1 : S6 kinase 1

SA-β-gal : SA-β-galactosidase

SASP : Senescence-associated secretory phenotype

SCC : Squamous cell carcinoma

SDD : Helical scaffold/dimerisation domain

SET9 : Suppressor of variegation-enhancer of zeste-trithorax

SIKE1 : Suppressor of IKBKE1

SINTBAD= TBKBP1 : tumor necrosis factor family member-associated NF-  $\kappa$ B activator binding kinase 1 binding protein

SIP1 : Smad interacting protein 1

SIRT1 : Silent information regulator 1

SKP2 : Phase S kinase -associated protein 2

Sox4 : SRY (sex determining region Y)-related HMG-box

STAT : Signal transducers and activators of transcription

---

## T

TA1/2 : Transactivation1/2

TAM : Tumor-associated macrophage

TANK : TRAF family member associated NF- $\kappa$ B activator

TBK1 : TANK binding kinase-1

TBKBP1 : Tank Binding Kinase 1 binding protein 1

TCF / LEF : T-cell and lymphoid enhancer factors

TCR : T cell receptor

TEM : Epithelial–mesenchymal transition

TGF- $\beta$  : Tumor growth factor

TICAM1 : Toll- IL1- receptor Containing Adapter Molecule 1

TIM : Tumour-infiltrating macrophages

TIM3 : T cell membrane protein 3, connu comme HAVcr2

TLRs : Toll-like receptors

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha

TNFAIP3 : Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3

TNFR : Tumor necrosis factor receptor

TRADD : Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

TRAF : TNF receptor-associated factor

Treg : Lymphocytes T régulateurs

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

TRPS1 : Trichorhinophalangeal 1

## **U**

---

ULBPs : UL16 binding proteins

ULD : Ubiquitin-like domain

UTR : Untranslated region

## **V**

---

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VISTA : V-domain Ig suppressor of T cell activation

## **X**

---

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

## **Y**

---

YB-1 : Y-box binding protein 1

**Z**

---

ZF : Zinc finger domain

ZFH : zing-finger E-box binding homeobox

ZO-1 : zona occuldens protein 1



# INTRODUCTION



# I. ONCOGENESE ET TEM

## 1. ONCOGENESE

L'oncogenèse (en grec « oncos » signifie « tumeur »), correspond à la transformation de cellules normales en cellules tumorales. Cette modification entraîne des changements successifs comme une indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs (transduction du signal et activation du cycle cellulaire), une résistance à l'apoptose, une immortalité (réactivation de la télomérase), une capacité d'induire l'angiogenèse, une capacité d'invasion tissulaire et une diffusion métastatique.

### A) Les principales étapes de l'oncogenèse

Dans Nature Medecine, Wan et ses collègues ont décrit quatre principales étapes de l'oncogénèse : l'initiation, la promotion, la progression et la survenue de métastases.

L'initiation: Elle correspond à l'altération d'une cellule au niveau de l'ADN (mutations génétiques et dérégulations épigénétiques). Dans le cas des mutations génétiques, elles doivent intervenir aussi bien sur les oncogènes (gène responsable de tumeur) et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les dérégulations épigénétiques correspondent à des altérations du mécanisme cellulaire modifiant l'expression des gènes sans altérer l'ADN. Ces modifications favorisent la progression tumorale en augmentant l'expression des oncogènes tout en diminuant, voire supprimant, les gènes suppresseurs de tumeurs. Les cellules perdent alors plus ou moins leurs caractéristiques d'origine suivant le type de cancer indifférencié, anaplasique ou différencié.

La promotion (de la cellule cancéreuse à la tumeur): Les cellules ainsi modifiées se développent et prolifèrent en formant un groupe de cellules transformées identiques

(population monoclonale). Certaines cellules de cette population peuvent elles-mêmes subir de nouvelles mutations, ce qui génère de nouvelles populations. Les mutations se font au hasard et la population possédant les mutations les plus avantageuses acquiert alors un avantage sélectif lors de la progression. C'est à partir de cette population sélectionnée que se poursuit l'oncogenèse.

**La progression:** Une fois que les cellules ont acquis les caractéristiques d'une cellule cancéreuse, elles se multiplient de façon anarchique, parviennent à provoquer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui irrigueront la tumeur et l'alimenteront en oxygène et en nutriments (l'angiogenèse). La progression comprend la phase d'invasion de l'environnement de la tumeur primitive ainsi que la constitution des lésions à distance.

**Métastase:** Les cellules cancéreuses via le sang et la lymphé sont maintenant en contact avec d'autres régions du corps formant les métastases. La propension métastatique d'une tumeur est dépendante de l'origine de la cellule et des mutations génétiques. Les mêmes altérations oncogéniques à différents stades de différenciation, peuvent conduire à des tumeurs métastatiques ayant des comportements différents. A l'inverse, la même cellule touchée par différentes mutations peut donner lieu à des tumeurs à potentiel métastatique distinct. Quand la diffusion de métastase commence tôt, différents clones de cellules tumorales sont ensemencées en parallèle dans différents organes ; ils restent dormants ou se développent en métastase. Quand les cellules tumorales sont soumises à la sélection clonale, les clones ayant acquis les mutations favorables à leur développement prolifèrent de manière dominante. Il en résulte un degré d'hétérogénéité génétique au sein des tumeurs (Wan et al., 2013).

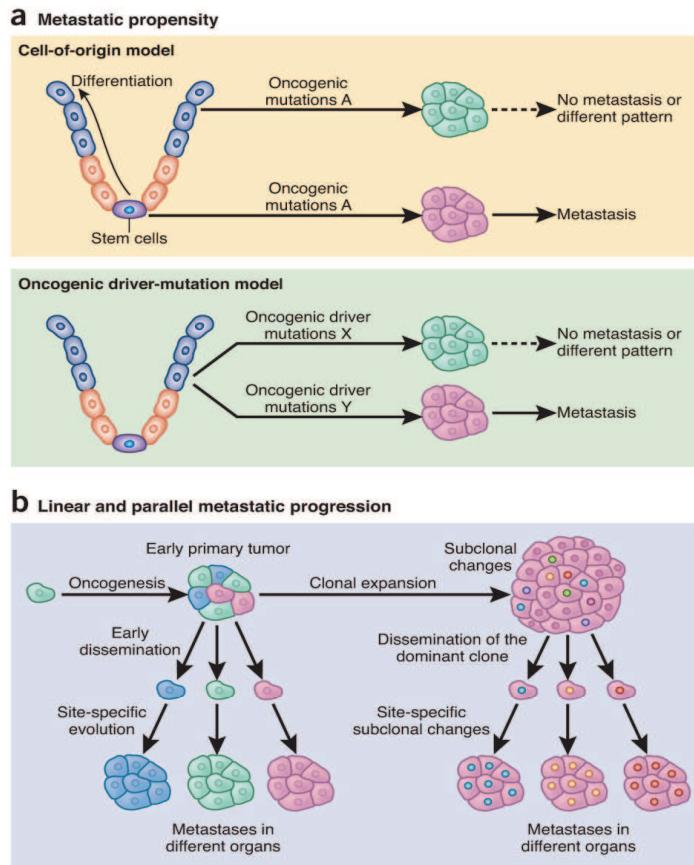


Figure 1 : Le cancer est une maladie dont l'évolution est clonale.

La propension métastatique d'une tumeur est influencée par la cellule d'origine et les mutations génétiques (a). Si la diffusion métastatique commence tôt, différents clones de cellules tumorales sont ensemencées en parallèle à différents organes ; où ils restent dormants ou se développent en métastase. Mais quand les cellules tumorales sont soumises à la sélection clonale, les clones dominant se dilatent et subissent les modifications subcloniales résultant en différents degrés de l'hétérogénéité des tumeurs. Lorsqu'elles diffusent, ces cellules hétérogènes colonisent différents organes (b) (Wan et al., 2013).

### Promotion et hétérogénéité tumorale

L'hétérogénéité inter-patients du microenvironnement tumoral peut être responsable des différences de réponses aux traitements. L'origine de la tumeur, les polymorphismes des gènes régulateurs du système immunitaire ou encore les facteurs environnementaux sont autant de sources possibles de variabilités. Les modèles suivants ont été proposés pour expliquer l'arbre phylogénétique des tumeurs :

Cancer comme un système évolutif basé sur l'acquisition de mutations (Nowell, 1976) : Les tumeurs proviennent d'une seule cellule «mutée». La plupart des néoplasmes (nouvelle formation, autrement dit tumeur) proviennent d'une seule cellule d'origine. Lors de la progression, le clone d'origine a acquis une variabilité génétique, suivie d'une sélection des lignées plus agressives.

Cancer et microenvironnement (Merlo et al., 2006) : Dans une tumeur, les cellules mutantes sont en compétition pour l'espace, les ressources et pour échapper au système immunitaire. Elles peuvent même coopérer avec l'environnement pour l'invasion et

coloniser de nouveaux organes. Un autre paramètre de l'environnement pouvant exercer une pression de sélection sur l'évolution tumorale est l'hypoxie. Enfin, l'exposition à des traitements peut induire grand nombre de résistance générant des mutations de plus en plus variées, ce qui pose problème pour le traitement de cette maladie.

Hétérogénéité intratumorale (Gerlinger et al., 2012) : Les récents progrès en Biologie Moléculaire ont permis une résolution plus élevée et une analyse plus rapide des génomes individuels des cancers au niveau d'un nucléotide et de montrer l'hétérogénéité intratumorale avec des altérations somatiques limitées entre les tumeurs des mêmes sous-types histologiques. L'hétérogénéité intratumorale conduit à une sous-estimation du paysage de la génomique des tumeurs fondée à partir d'une biopsie unique et par cette voie entrave les stratégies thérapeutiques.

## B) Proto-oncogènes et anti-oncogènes

Le groupe de gènes mutés provoquant la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses est nommé proto-oncogènes (Adamson, 1987). Contre les oncogènes pouvant provoquer un cancer, notre organisme possède des anti-oncogènes, nommés aussi suppresseurs de tumeur, dont la fonction est d'empêcher la dérégulation de la division cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose.

### Identification des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs :

Le premier gène dont la mutation déclenche une forme de cancer appelée sarcome de Rous, a été identifié chez le poulet en 1976 par Peyton Rous et sa découverte a été récompensée par le prix Nobel de Médecine. En 1980, Geoffrey Cooper et Robert Weinberg montrent que, dans les cellules saines, des gènes appelés les proto-oncogènes, contrôlent le rythme de la division cellulaire. Quand les proto-oncogènes subissent une accumulation de mutations qui les transforme en oncogène, ils transforment une cellule saine en une cellule maligne et les divisions cellulaires deviennent incontrôlées, jusqu'à la formation de tumeurs. L'étude précise que des mécanismes d'action permettent de distinguer plusieurs familles d'oncogènes, se basant sur le rôle physiologique de la protéine normale :

- les oncogènes qui codent pour des facteurs de croissance : l'oncogène v-int-1 et v-int-2 (insertion du virus mammaire de souris MMTV) qui codent pour un FGF, l'oncogène v-sis (Simian Sarcoma Virus ou SSV) qui code PDGF.
- les oncogènes codant pour les récepteurs membranaires à activité protéine kinase: l'oncogène v-erb-B, qui est homologue au EGFR.
- les protéine-kinases cytosoliques
- les protéines à activité nucléaire : fos, jun et c-myc
- les oncogènes codant pour les facteurs de transcription
- les G-protéines ou protéines membranaires liant le GTP : famille ras etc...

KRAS, NRAS, c-myc, etc. sont les principaux oncogènes identifiés pratiquement dans tous les cancers humains.

Par ailleurs, il existe dans les cellules normales des gènes dont l'activité contrebalance celle des oncogènes activés, et qu'on appelle, pour cette raison, gènes anti-oncogènes ou encore gènes suppresseurs de tumeurs. Par exemple, le transfert d'un chromosome 11 humain normal dans une cellule tumorigène dérivée d'une tumeur rénale de Wilms lui fait perdre sa tumorigénérité. Le premier gène suppresseur de tumeur, Rb1, a été découvert dans le rétinoblastome, un cancer de l'œil chez l'enfant. Par la suite, de nombreux gènes suppresseurs ont été découverts. Certains gènes suppresseurs sont inactivés ou mutés dans des cancers très spécifiques : BRCA1/2 dans les cancers du sein, d'APC dans les cancers du colon, WT1 dans les cancers du rein. D'autres gènes suppresseurs de tumeurs ont un spectre d'inactivation plus large, comme p53 qui est inactivé dans un grand nombre de cancer.

Mais la frontière entre oncogène et anti-oncogène est imprécise. Par exemple une simple mutation du gène p53 entraîne « le passage » de la catégorie d'anti-oncogène à celle d'oncogène. De plus, la même protéine peut agir comme un frein ou un accélérateur selon les facteurs de croissance présents dans le milieu de culture (exemple : la surexpression de la protéine Myc induit la prolifération ou la mort cellulaire). Des études expérimentales montrent que la réintroduction d'un gène suppresseur de tumeur de type sauvage (par exemple ceux codant pour p53, Rb, ou APC) dans des cellules cancéreuses humaines dans lequel le gène endogène respectif était inactif, ont causé une inhibition marquée de la

croissance, une induction de l'apoptose ou une inhibition de la tumorigénèse chez la souris (Weinstein, 2000). A l'inverse, l'inactivation ou les mutations de ce gène rend les cellules cancéreuses plus agressives via l'induction de la TEM (Wang et al., 2013).

## 2. TEM

La TEM (Epithelial–Mesenchymal Transition) a été observée pour la première fois en 1980 par Elizabeth Hay, dans une ligne primitive d'embryons de poulet. La TEM caractérise un processus dynamique au cours duquel les cellules perdent un nombre important de leurs caractéristiques épithéliales pour gagner des propriétés de cellules mésenchymateuses, ce qui nécessite des modifications architecturales et fonctionnelles complexes.

### A) L'adhésion cellulaire

L'adhésion est un processus nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. Les anomalies de ce processus peuvent causer différentes pathologies: la croissance tumorale, l'invasion, les métastases, la transition épithélio-mésenchymateuse et influencer les réponses immunitaires des cellules malignes. L'adhésion cellulaire se réalise en plusieurs étapes: la phase d'approche, l'interaction primaire et la consolidation. Les grandes familles de molécules participant à l'adhésion sont les suivantes :

- Les cadhérines
  - ✓ Cadhérines classiques:
    - E – cellules épithéliales et embryonnaires
    - P – placenta et épidermes
    - N – neurones et muscles
    - VE – cellules endothéliales vasculaires
  - ✓ Cadhérines non classiques:
    - Les cadhérines desmosomales
    - Les proto-cadhérines
- La superfamille des Ig impliquées dans le cancer
  - ✓ ICAM: Intercellular CAM

- ✓ VCAM: Vascular CAM
- ✓ NCAM: Neural CAM
- ✓ PECAM : Platelet-Endothelial CAM
- ✓ MadCAM : Mucosal adressin CAM
- ✓ CEA : Carcinoembryonic Antigen
- Les intégrines (p.ex. LFA-1, MAC-1 et VLA-4)
- Les sélectines
  - ✓ CD62E : cellules endothéliales activées
  - ✓ CD62P: plaquettes
  - ✓ CD62L: leucocytes
- Les mucines membranaires (CD43, PSGL-1)

Le densité des molécules participant à l'adhésion, leur diffusion sur la membrane plasmique, leur longueur et leur flexibilité influencent toutes les étapes de l'adhésion (Cozens-Roberts et al., 1990).

Les cellules épithéliales sont intimement jointes entre elles par des structures membranaires hautement spécialisées. La cohésion des tissus épithéliaux dépend essentiellement de trois types de jonctions d'adhérence intercellulaires : les jonctions serrées (ou «zonula occludens»), les jonctions adhérentes (ou «zonula adherens») et les desmosomes. Elles sont caractérisées par une polarisation apico-basale, une répartition localisée des molécules d'adhésion (intégrines et cadhérines), une latéralisation des jonctions intercellulaires, une polarisation des filaments d'actine et reposent sur une lame basale au pôle basal des cellules. Les cellules épithéliales disposent d'une certaine mobilité qui leur permet de se déplacer au sein de la couche cellulaire à laquelle elles appartiennent, mais elles ne peuvent pas, en temps normal, sortir de cette couche. Les cellules mésenchymateuses, ne forment pas de couches organisées et n'ont pas de polarisation apico-basale. Ces cellules n'ont que de rares contacts focaux avec les autres cellules et ne reposent pas sur une lame basale. En culture, elles sont très mobiles avec une forme ameubodale ou fibroblastique. La plasticité des cellules mésenchymateuses permet leur migration qui requiert la sécrétion d'enzymes protéolytiques détruisant la matrice extracellulaire afin d'envahir l'interstitium (Thiery and Sleeman, 2006).

La transition d'un phénotype cellulaire à un autre recouvre un large spectre de modifications inter et intracellulaires rarement observées en totalité impliquant que la TEM n'est pas nécessairement un changement complet de lignage cellulaire (Thiery and Sleeman, 2006).

## *B) Les étapes principales de la TEM*

La déstabilisation de l'intégrité de l'épithélium et la perte de contact des cellules entre elles en conséquence d'une diminution de l'expression de la E-cadherine et de ZO-1 (zona occuldens protein 1) sont les premières étapes de la TEM. La perte d'expression de la E-cadherine libère la  $\beta$ -catenine dans le cytoplasme qui peut constituer un complexe transcriptionnel avec LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor 1) ou Smad3 qui va alors activer la transcription de gènes impliqués dans la TEM. Ensuite, survient la réorganisation du cytosquelette d'actine avec la formation de fibres de stress, la synthèse de  $\alpha$ -SMA (Alpha-Smooth Muscle Actin) et la conversion des filaments intermédiaires d'un type épithélial (cytokératine) en un type mésenchymateux (vimentine). L'acquisition de l' $\alpha$ -SMA donne à la cellule des propriétés contractiles qui lui permettent de migrer et c'est alors qu'elle devient un myo-fibroblaste. La migration à travers la membrane basale tubulaire nécessite la digestion préalable de deux de ses principaux constituants, le collagène IV et la laminine, par l'intermédiaire des protéases matricielles MMP2 et -9 (Matrix metalloproteinase), dont l'expression est augmentée par le TGF- $\beta$  (tumor growth factor). Enfin, les myofibroblastes mobiles dans l'interstitium synthétisent des constituants de la matrice extracellulaire, fibronectine, collagènes 1 et 3.

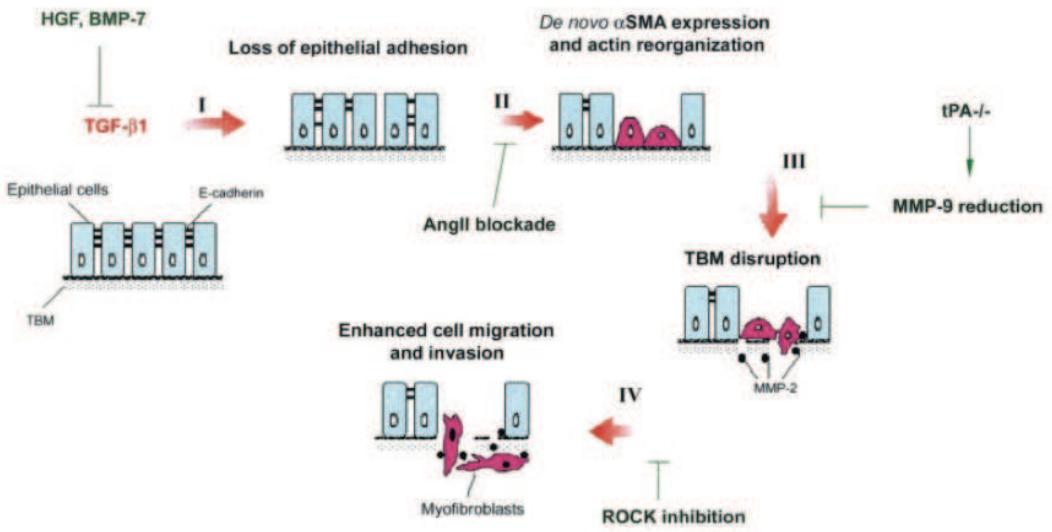


Figure 2 : Les étapes principales de la TEM.

La TEM se compose de quatre étapes clés: 1) la perte d'adhérence des cellules épithéliales, 2) la réorganisation de l'actine, 3) la perturbation de la membrane basale tubulaire, 4) l'augmentation de la migration et l'invasion cellulaire. Le TGF- $\beta$ 1 est l'unique facteur capable d'induire les quatre étapes de la TEM chez les cellules épithéliales. L'angiotensine II (AngII) induit la TEM en favorisant l'expression de  $\alpha$ SMA par TGF- $\beta$ 1, mais il ne parvient pas à induire  $\alpha$ SMA par lui-même.

Au contraire, HGF (Hepatocyte growth factor) et BMP-7 (Bone morphogenetic protein) pourraient antagoniser TGF- $\beta$ 1 et par conséquence inhiber l'initiation de la TEM. (I) Le blocage de AngII abolit son activité en tant que promoteur de TEM et atténue la fibrose rénale (II). La préservation de l'intégrité de la TBM bloque sélectivement la TEM dans la néphropathie obstructive (III). L'inhibition pharmacologique de ROCK (Rho-associated kinase) inhibe la migration cellulaire et réduit la fibrose rénale (IV) (Liu, 2004).

### C) Biomarqueurs de la TEM

La notion de TEM est très vaste, en effet il y a plusieurs protéines surexprimées et réprimées, ce qui rend difficile la définition précise du phénotype et une standardisation des critères.

Protéines réprimées : E-cadhérine,  $\beta$ -cathénine, Cytokeratine-18, Desmoplakine, Muc-1, Syndécan, ZO-1, Claudin 1/4, Occludines, Intégrine  $\alpha$ 6 $\beta$ 4, Ig-CAMs, famille mir 200, famille Let-7.

Protéines surexprimées : Vimentine, N-cadherine,  $\alpha$ 1 collagen, OB-cadhérine, Intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, Intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 6, FGF-R, Ig-CAMs,  $\alpha$ -SMA, Syndecan-1, Collagène type 1/3, E47/TCF3, ID1/ID2 Ets, FGF-1,2,3, Fibronectine, FSP1/S100A4, FTS binding protein, MMP-2/9, PAI-1, RhoB, Scratch, Zeb1 (TCF8), SIP1(Zeb2), Snail, Slug(Snail2), Smuc(Snail3), Twist 1/2, LEF-

1, TGF- $\beta$ , Thrombospondine, Rho GTPases, Laminine 5, Fibroblast Activation Protein, FGF, Ets-1, E2-2 (TCF4), LEF1 (TCF1), FOX-C2, Goosecoid, miR10b, miR21, miR661.

Protéines relocalisées : E-cadhérine,  $\beta$ -cathénine,  $\beta$ -actine, Myosine II, Rho GTPases, Tubuline, Snail, LEF1/TCF1, Smad 2/3

#### *Switch des cadhérines pendant la TEM*

La TEM se déroule en plusieurs étapes successives : la première étape se caractérise par une disparition des contacts inter-cellulaires entraînant la perte de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, cytokératines) et le gain de marqueurs mésenchymateux (Vimentine, N-cadhérine).

#### *Les cadhérines sont réprimées pendant la TEM*

Toute une variété de biomarqueurs est utilisée pour caractériser la TEM, mais la perte d'expression de la E-cadhérine constitue un des événements majeurs de la TEM. La E-cadhérine (Epithelial-cadherin) est une glycoprotéine transmembranaire de 120 kD, composée de trois domaines permettant une interconnexion avec le cytosquelette d'actine de deux cellules épithéliales voisines (Peinado et al., 2005a). La E-cadhérine est liée aux caténines ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, caténine /plakoglobin), qui relient la E-cadhérine au cytosquelette d'actine. La répression d'E-cadhérine est suffisante pour déclencher de nombreuses voies de signalisation conduisant à la TEM. Les études IHC sur des biopsies de tumeurs ont montré que la perte de la E-cadhérine est corrélée à l'invasivité tumorale, à la présence de métastases, et à la mortalité des patients (Birchmeier and Behrens, 1994)(Mareel et al., 1994). L'interruption de la fonction de la E-cadhérine peut se produire par plusieurs mécanismes, mais elle implique fréquemment la délétion ou la mutation du gène CDH1 (gène codant pour Ecadhéerin) (Conacci-Sorrell et al., 2002). 84% des changements d'expression des gènes qui ont eu lieu après la perte d'E-cadhérine n'étaient pas dépendants de la fonction  $\beta$ -caténine. Cela montre que d'autres régulateurs de transcription sont impliqués dans la médiation des changements de transcription après la perte de E-cadhérine (Onder et al., 2008). Par contre les domaines libres issus du clivage de la E-cadhérine par les MMPs bloquent directement la signalisation de la  $\beta$ -caténine (Crawford et al., 1999) et favorisent l'invasion tissulaire (Noë et al., 2001). Quant à la surexpression de la E-cadhérine,

cela diminue les capacités invasives de plusieurs lignées tumorales (Semb and Christofori, 1998).

Les fonctions de l'E-cadhérine ne se limitent pas à la seule adhésion intercellulaire, elles interviennent aussi un rôle dans la prolifération, le cycle cellulaire et l'apoptose. La E-cadhérine est impliquée dans l'oncogenèse et la TEM via des interactions avec des protéines cytosoliques (APC, rho GTPases...) et transmembranaires (Wnt, ERBB2, EGF-R, TGF- $\beta$ -R....) (Perrais et al., 2007)(Stockinger et al., 2001).

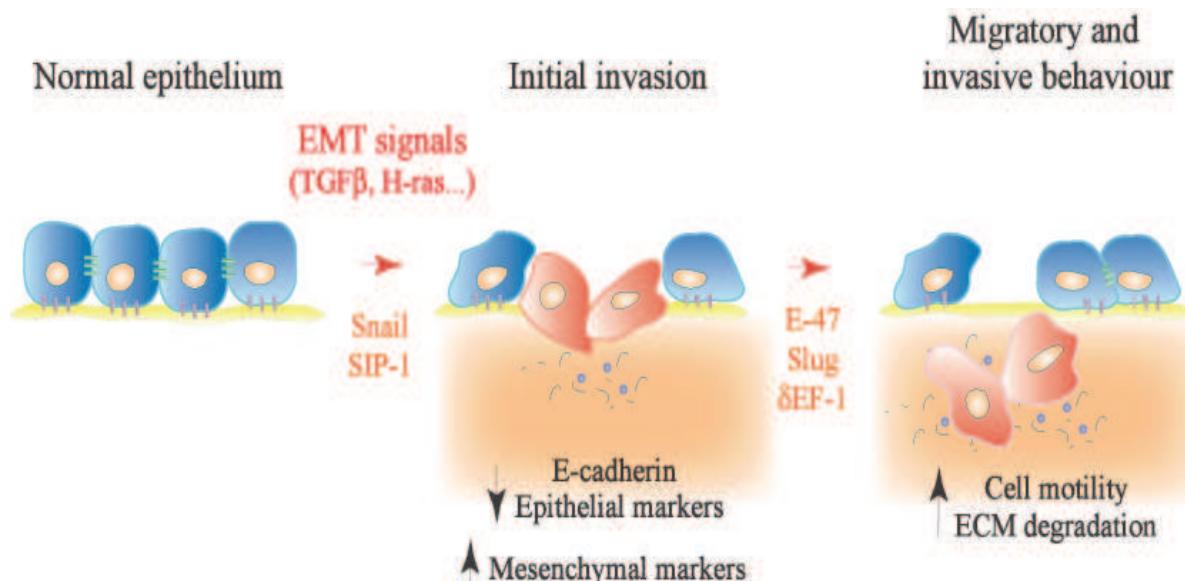


Figure 3 : Participation des différents répresseurs d'E-cadhérine pendant l'invasion tumorale.

Plusieurs répresseurs comme Snail et SIP1(Smad interacting protein 1) jouent un rôle dans la première étape de la progression de la tumeur conduisant à l'initiation du processus invasif à travers la diminution de la E-cadhérine et d'autres marqueurs épithéliaux, et l'induction de marqueurs mésenchymateux avec une capacité pro-invasive. D'autres répresseurs, comme Slug ou E-47, contribuent au maintien du phénotype malin en soutenant la répression d'E-cadhérine. (Peinado et al., 2004)

Il a été démontré que la fixation de la  $\beta$ -caténine assure une protection du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine contre la protéolyse. Dans une cellule épithéliale, la  $\beta$ -caténine est sous-membranaire du fait de son interaction physique avec l'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes. Par contre, dans une cellule mésenchymateuse, elle est dissociée des jonctions par la perte de l'expression de l'E-cadhérine. La beta-caténine se localise alors dans le cytoplasme où elle sera soit dégradée suite à sa phosphorylation par la kinase GSK3 (Glycogen Synthétase Kinase 3), qui sert de signal d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome ; soit transloquée dans le noyau, où elle s'associe avec les co-

facteurs de transcription LEF/TCF afin d'induire ou de réprimer l'expression des gènes cibles. La  $\beta$ -caténine, libérée par l'interaction CagA/E-cadhérine, stabilisée par l'activation de la voie Wnt et transloquée dans le noyau, devient un facteur de transcription associé aux co-facteurs LEF/TCF (Huber and Weis, 2001).

#### Les cadhérines surexprimées pendant la TEM

En parallèle de la perte de E-cadhérine par des cellules épithéliales, certaines cadhérines comme celle de type N (*CDH2*) et P (*CDH3*) peuvent être exprimées dans les cellules subissant une TEM (Peralta Soler et al., 1999). Le passage d'un état pro-adhésif (lié à l'expression de la E-cadhérine), à un état pro-migratoire (avec expression de cadhérines spécifiques développant des interactions plus faibles et plus permissives à la mobilité) rend l'invasion tumorale et les métastases possibles (Cavallaro and Christofori, 2004). La vimentine est devenue un marqueur par excellence des phénomènes de TEM dans presque tous les processus physiologiques ou pathologiques (Hay and Zuk, 1995). La vimentine est un membre de la famille des filaments intermédiaires qui constitue le cytosquelette avec les microtubules et les microfilaments d'actine. Mais la vimentine est une structure dynamique, en différence de la plupart des filaments avec des structures stables. L'induction de la vimentine est corrélée à des propriétés migratoires et invasive de nombreux cancers (Singh et al., 2003)(Korschning et al., 2005) ; ainsi la perte d'expression de la vimentine réduit la croissance tumorale(Zhang et al., 2009)(Wu et al., 2009a). L'expression de la vimentine est corrélée à un mauvais pronostique dans des biopsies des carcinomes du sein, du poumon, des ovaires, de la thyroïde, du rein, de la prostate et de la peau (Leader et al., 1987)(Domagala et al., 1990)(Kokkinos et al., 2007).

#### Le phénotype CSCs

Les CSCs (cellules souches du cancer) sont des cellules présentes dans de nombreuses tumeurs capables d'auto-renouvellement pour initier la tumorigénèse. Les CSCs sont liées à la formation de métastases, l'invasion et la résistance aux traitements. CD44, CD133 et CD166 sont des marqueurs de CSCs. Il y a une relation complexe entre la TEM, le phénotype CSCs et le comportement agressif des cellules cancéreuses. L'induction de la TEM par différents facteurs aboutit à l'enrichissement par les CSCs associé à l'apparition de

métastases. Grâce à l'activation de la voie de signalisation RAS/MAPK, une lignée cellulaire épithéliale mammaire non tumorigène (CD44low et CD24high) peut évoluer vers un phénotype souche (CD44high et CD24low) de type mésenchymateux qui s'observe par la perte de l'E-cadhérine et l'expression de la Vimentine. Ainsi, la perte de E -cadhérine aboutit à la TEM et induit une augmentation du nombre de cellules CD44high/CD24low (Ginnebaugh et al., 2014).

### C) Les types de TEM

On observe trois différents types de TEM dans les processus physiologiques et pathologiques.

#### TEM physiologique

La TEM physiologique s'observe lors de l'embryogenèse et le processus de cicatrisation.

##### TEM de type 1 (Embryogenèse)

Dès le stade de pré-implantation, l'apparition des cellules épithéliales et leurs conversions en cellules mésenchymateuses est observée chez l'homme. Le mésoderme est un mésenchyme primaire (*du latin «mesenchyma» : «meso», milieu et «enchyma», infusion*) issu de l'activation d'un programme TEM dans les cellules de l'épithélium épiblastique. Durant l'embryogenèse, toutes les cellules mésenchymales ne dérivent pas du mésoderme. Le développement embryonnaire, l'organisation tridimensionnelle de nombreux organes nécessitent très tôt la migration coordonnée de groupes de cellules qui répondent à la stimulation de signaux chimiques extracellulaires. Au cours de l'embryogenèse, la TEM est impliquée dans la gastrulation, la formation de la crête neurale, des valves cardiaques etc. (Meulemans and Bronner-Fraser, 2004)(Gershengorn et al., 2004)(Thiery and Sleeman, 2006). Ce type de TEM se fait sous le contrôle de signaux locaux et aboutit à des phénotypes mésenchymateux transitoires et réversibles destinés à générer des épithéliums secondaires. Le caractère réversible de la TEM par les processus de transitions mésenchymo-épithéliales

(MET) est probablement apparu plus tard au cours de l'évolution. La TEM de type 1 permet également des étapes de morphogenèse pouvant intervenir dans l'homéostasie chez l'adulte (glande mammaire, utérus, néo-angiogenèse...) (Demir et al., 2004)

#### TEM de type 2 (Cicatrisation)

La TEM de type 2 est associée aux phénomènes de cicatrisation et de régénération tissulaire ainsi qu'aux pathologies fibrotiques. Cette TEM est initiée par des signaux moléculaires pro-inflammatoires sécrétés par des cellules inflammatoires produites en réaction à une lésion et cesse souvent dès que l'inflammation transitoire s'atténue. La TEM induite lors des processus de réparation cellulaire a des mécanismes très similaires à ceux impliqués dans l'embryogenèse, mais les cellules générées sont des cellules non multipotentes dont la différenciation est très spécifique du tissu lésé. Contrairement à la TEM de type 1, les cellules qui se ré-épithélialisent reviennent à leur état d'origine sous forme d'un épithélium différencié. (Kalluri and Neilson, 2003)(Radisky et al., 2007).

#### TEM pathologique

La TEM pathologique s'observe lors de néoplasie et de fibrose avec des modifications morphologiques et géniques communs.

#### TEM de type 2 (Fibroses)

Le processus de cicatrisation peut aboutir à la production en excès de tissu conjonctif pour remplacer le tissu original et générer une dysfonction organique. Ainsi, la TEM aboutit à la fibrose dans certains organes possédant une organisation de type tubulo-lobulaire comme poumon, foie, rein et glande mammaire (Iwano et al., 2002). Dans certains cas, la fibrose peut se prolonger et donner naissance à une inflammation continue, pouvant entraîner la destruction de l'organe ou une transformation tumorale (Rastaldi et al., 2002).

#### TEM de type 3 (Tumorigénèse)

La TEM de type 3 s'observe dans le contexte de la progression tumorale et l'invasion métastatique. Les gènes impliqués dans la TEM oncogénique présentent de nombreuses similitudes avec les mécanismes intervenant dans la dispersion des cellules épithéliales

primaires au cours de l'embryogenèse, mais les cellules arborent de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques, notamment dans l'expression des oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeur (Kalluri and Weinberg, 2009).

Durant la TEM, les cellules cancéreuses perdent leurs propriétés adhésives et gagnent des propriétés migratrices et protéolytiques nécessaires à la formation de métastases. Au sein d'une même tumeur, le gain de marqueurs mésenchymateux et la perte de marqueurs épithéliaux, sont corrélés avec la progression tumorale et un mauvais pronostique (Moreno-Bueno et al., 2006) (Perl et al., 1998).

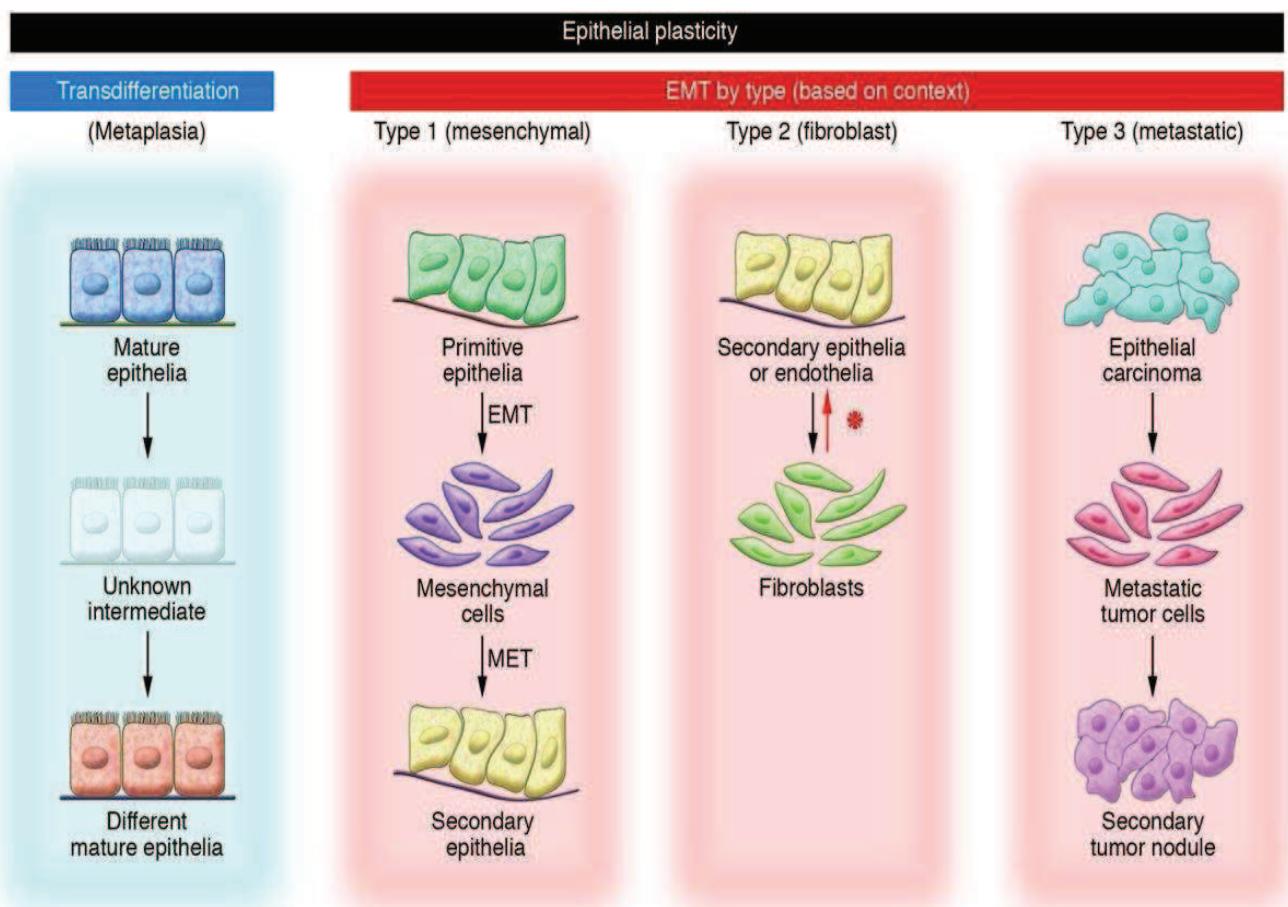


Figure 4 : Différents types de TEM.

La métaplasie représente un état de transdifférenciation entre deux types d'épithélium. Les 3 différents types de TEM. La TEM de type 1 (embryogenèse) aboutit à la production de cellules mésenchymateuses multipotentes capables de former de multiples tissus épithéliaux secondaires par MET. Lors de la TEM de type 2 (de régénération), les cellules produites sont des fibroblastes différenciés qui semblent revenir sous leur forme «originelle» en l'absence de signaux. La TEM de type 3 est impliquée dans la progression tumorale et l'invasion métastatique (Zeisberg and Neilson, 2009).

Les « dérivés » *in vivo* de la TEM de type 3 peuvent être de nature fibroblastique ou mésenchymateuse. (Radisky et al., 2007) . Il est très difficile de distinguer les cellules

mésenchymateuses primaires et les fibroblastes au niveau moléculaire, en effet tous les deux expriment la vimentine, sécrètent de la fibronectine, du collagène fibrillaire, des protéases et différents facteurs de croissance. La différence fondamentale entre ces cellules est leur état de différenciation. Les fibroblastes sont des cellules très différenciées, mais les cellules mésenchymateuses primaires expriment des marqueurs de pluripotence et sont capables de donner naissance à de nombreux types cellulaires. Les fibroblastes sont capables de migrer et de rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique par intravasation, mais leur survie est généralement de courte durée et ne donne pas lieu à la formation de nodules métastatiques secondaires (Koop et al., 1996).

## **II. PROCESSUS CELLULAIRE CONDUISANT A LA TEM**

### **A. LES ACTIVATEURS DE LA TEM**

La liste générale des candidats impliqués dans la régulation de la TEM est très longue: divers stimuli comme le TGF- $\beta$ , le FGF, l'EGF, l'IGF, l'HGF, le PDGF, les oestrogènes, Wnt, Shh, les cytokines inflammatoires, l'hypoxie, les oncogènes RasV12, ErbB2, p53 mutée etc (Thiery et al., 2009). Les activateurs de la TEM comme le TGF- $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'HGF produits par les cellules stromales ou par les cellules tumorales induisent l'activation de facteurs transcriptionnels de la TEM (Thiery and Sleeman, 2006) comprennent les membres de la famille bHLH (basic helip-loop-helix family), GSC (Goosecoid), ZFH (zing-finger E-box binding homeobox) (Peinado et al., 2007). Au cours de cette thèse, parmi divers activateurs de la TEM, nous allons nous intéresser plus particulièrement au rôle du TGF- $\beta$  et du TNF- $\alpha$  (facteur lié à l'inflammation) dans l'induction de la TEM. En effet, dans notre projet, nous avons utilisé la lignée de cancer pulmonaire A549 dont l'exposition aux cytokines TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$  permet l'induction de la TEM de manière réversible.

#### TGF- $\beta$

La famille TGF- $\beta$  comprend trois isoformes de TGF-  $\beta$  (TGF- $\beta$ -1, -2, -3), et d'autres cytokines impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaire comme les BMP (bone morphogenetic proteins), les inhibines et les activines. (Xu et al., 2009). Les trois isoformes du TGF- $\beta$  sont codées par des gènes distincts, qui conservent toutefois 70% d'homologie entre eux (Massagué, 1998)(Derynck et al., 2001)(Chin et al., 2004)(Massagué, 2008). Les récepteurs du TGF-  $\beta$  sont composés de différentes sous-unités. Chez l'homme il

existe sept sous unités de type I et cinq sous unités de type II. Le TGF- $\beta$  se lie exclusivement à un récepteur tétramérique composé de la sous-unité de type I TGF-BR1 (ALK5 et T $\beta$ RI) et de la sous-unité de type II TGF- $\beta$ R2 (Massagué, 2012).

Le TGF- $\beta$  a des effets inhibiteurs et stimulant sur la prolifération des cellules, agissant comme suppresseur de tumeur et oncogène. Dans le développement, le TGF- $\beta$  favorise la différenciation des cellules et inhibe la prolifération ; alors que durant la tumorigénèse le TGF- $\beta$  sécrété par les cellules tumorales perd souvent sa fonction inhibitrice en faveur de son activité oncogénique (Siegel and Massagué, 2003)(Thiery, 2002)(Siegel and Massagué, 2003)(Dumont and Arteaga, 2003)(Yingling et al., 2004).

Le TGF- $\beta$  est un polypeptide régulateur multifonctionnel qui contrôle plusieurs aspects des fonctions cellulaires, comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'apoptose, l'adhésion, l'angiogenèse et l'immuno-surveillance. Le TGF- $\beta$  est la clé du renforcement de l'immuno-surveillance et les cellules tumorales qui秘rètent du TGF- $\beta$  en forte quantité sont protégées de l'immuno-surveillance. Le TGF- $\beta$  est la première voie de signalisation décrite pour induire la TEM. La voie de signalisation du TGF- $\beta$  est activée lors de la liaison du TGF- $\beta$  avec le complexe tétramérique membranaire composé des sous-unités T $\beta$ RII et T $\beta$ RI (SER/THR protéine kinases). La sous-unité T $\beta$ RII active par phosphorylation directe la sous-unité T $\beta$ RI. Cette dernière induit la phosphorylation des facteurs de transcription Smad2 et Smad3 qui se combinent avec Smad4 pour former un complexe trimérique. Ce dernier régule l'expression de gènes cibles, suite à sa translocation nucléaire. La signalisation Smad régule ainsi l'expression de trois facteurs de transcription, Snail/Slug, Zeb1/Zeb2, Twist qui sont impliqués dans le phénomène de transition-épithélio-mésenchymateuse.

Dans le cas de la lignée A549, le TGF- $\beta$  est capable d'induire la TEM avec la perte de l'E-cadherine et la réorganisation de F-actin. Cette TEM est améliorée par la présence des cytokines IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  et INF- $\gamma$ . L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  seuls sont aussi capables d'augmenter la TEM induite avec le TGF- $\beta$ . La combinaison du TGF- $\beta$  avec le TNF- $\alpha$  est capable de changer la morphologie des cellules au bout de 48h et de former des cellules fibroblastiques. Pourtant, le traitement seul avec le TGF- $\beta$  même au bout de 12 jours n'est pas capable d'avoir un tel effet (Liu, 2008). La TEM induite par le TGF- $\beta$  est aussi améliorée par la présence de

RAW264.7 qui secrète le TNF- $\alpha$  et cette TEM est bloquée lors du traitement avec l'inhibiteur sélectif de NF- $\kappa$ B, dehydroxy methyl epoxyquinomicin (Kawata et al., 2012). L'inhibition de Smad2 bloque aussi la TEM induite par le TGF- $\beta$  ; ce qui montre que cette TEM se réalise par une voie dépendante des Smads (Kasai et al., 2005).

Le TGF- $\beta$  active également des voies de signalisation Smad-indépendantes impliquées dans la TEM, comme par exemple les petites protéines GTPases (Rho, Rac et cdc42), la voie des MAPKinasés(mitogen-activated protein kinase) avec notamment les c-jun-N terminal kinases, toutes deux impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la plasticité cellulaire;ou bien la voie PI3K/Akt qui inhibe la glycogène-synthase kinase 3 (GSK3 $\beta$ ) et active la voie Wnt. L'activation de MAPK et de PI3K complète et converge avec la signalisation SMAD. Ces voies peuvent être antagonistes des voies de signalisation intégrant les protéines SMAD dans d'autres contextes.(Massagué, 2008)(Wu and Hill, 2009)(Moustakas and Heldin, 2009)(Holm et al., 2011). NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ -light chain-enhancer of activated B cells), et PI3 kinase / AKT participent également à la signalisation du TGF- $\beta$ . Toutes ces voies de signalisation sont interconnectées. Par ailleurs, il existe des signalisations croisées entre les différentes voies du TGF- $\beta$  et d'autres voies de signalisation : par exemple, l'activation des protéines Smad peut également activer le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) et induire la TEM (Gui et al., 2012) (Kang et al., 2012). Néanmoins, il semble que la signalisation Smad-dépendante du TGF- $\beta$  soit nécessaire à la conversion phénotypique ; car la surexpression de Smad7, une Smad inhibitrice de Smad2, bloque la TEM (Xu et al., 2009).

Les protéines Smad 1-8 sont des effecteurs de la voie de la signalisation du TGF- $\beta$ . Smad3 est le médiateur spécifique de l'action du TGF- $\beta$ , tandis que Smad 1, 2, 5 et 8 servent souvent comme l'intermédiaire pour les actions des autres membres de famille TGF- $\beta$ . Smad 6 and 7 sont les Smads inhibiteurs, qui régulent négativement la signalisation TGF- $\beta$  / BMP. Par exemple, Smad7 se lie avec SMURF pour former l'ubiquitine ligase E3 qui cible le récepteur du TGF- $\beta$  et induit sa dégradation (Kavsak et al., 2000). La liaison de Smad7 et de SMURF au récepteur se traduit également par une inhibition compétitive de liaison de Smad2/3 à T $\beta$ RI (Bierie and Moses, 2006) (Inoue and Imamura, 2008). Les Smad 6 et 7 inhibent également la signalisation TGF- $\beta$ /BMP dans le noyau en interagissant avec les

répresseurs de la transcription, tels que les histones désacétylases, ou perturbent la formation du complexe fonctionnel Smad-ADN induit par le TGF- $\beta$ (Li et al., 2006).

Dans les cellules épithéliales les protéines SMAD activées par le TGF- $\beta$  impliquent l'expression des facteurs de transcription ATF3 (Activating Transcription Factor 3) et SNAIL, et coopèrent avec ces protéines pour réprimer l'expression de ID1 et de CDH1 (gène codant E -cadherin). LEF1 (l'effecteur de voie WNT) et Smad4 se sont révélés être nécessaires à la régulation positive des marqueurs mésenchymateux comme la Vimentine et la Fibronectine et cela indépendamment de la bêta-caténine. Ainsi, LEF1 co-occupe le promoteur CDH1 avec les protéines SMAD, fournissant un mécanisme moléculaire pour la coopération observée pendant le TEM entre la voie WNT et le TGF- $\beta$  (Nawshad et al., 2007).

Des niveaux accrus de TGF- $\beta$  ou de son récepteur dans les cellules cancéreuses, s'observent par une augmentation autocrine de la signalisation du TGF- $\beta$  dans le microenvironnement tumoral, et permettent aux cellules cancéreuses d'utiliser la signalisation TGF- $\beta$  comme une clé pour survivre et échapper en formant des métastases (Massagué, 2008), (Ikushima and Miyazono, 2010). Le TGF- $\beta$  joue un rôle majeur dans la progression des cancers en induisant la TEM via l'acquisition de propriétés CSC (Mani et al., 2008) (Morel et al., 2008) (Scheel et al., 2011). Les nouveaux mécanismes du contrôle épigénétique de l'épissage alternatif, les miRs et les modifications post-traductionnelles régulent également le TEM induite par le TGF- $\beta$ . En effet, les voies de signalisation impliquant le TGF- $\beta$  activent directement l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la TEM, tels que Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, et Twist (Peinado et al., 2007)(Moustakas and Heldin, 2012).

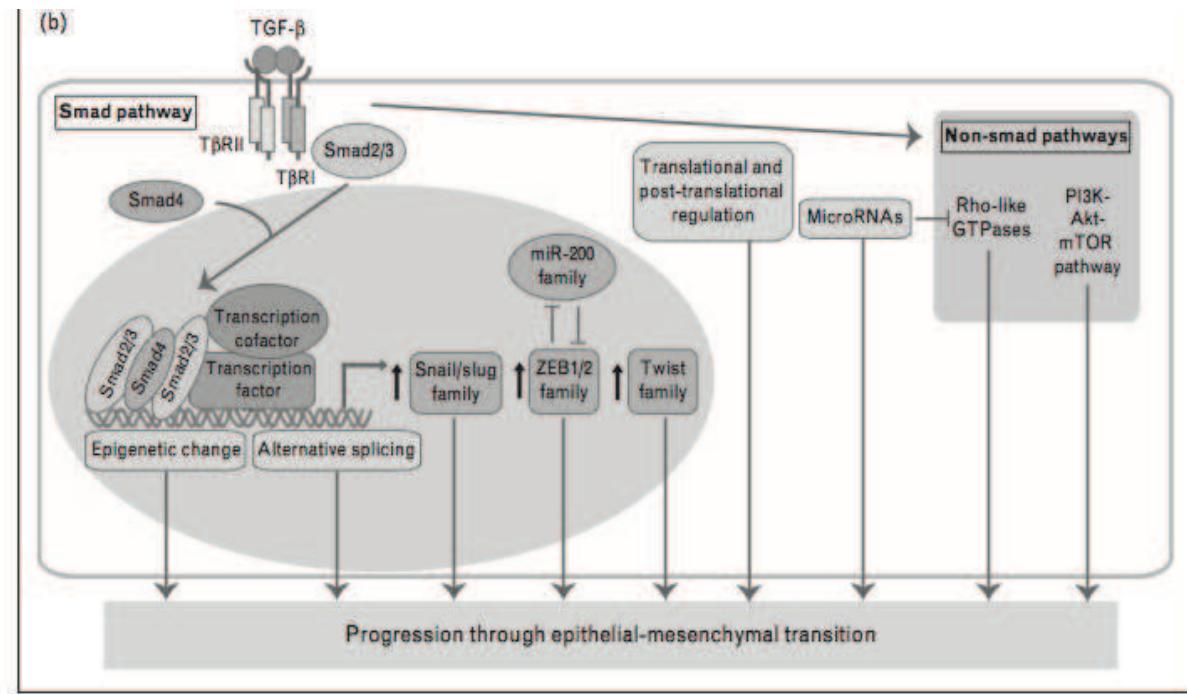


Figure 5 : TEM induite par TGF-  $\beta$ .

Le TGF- $\beta$  induit la TEM par la voie Smad dépendante et indépendante. La signalisation TGF-  $\beta$  phosphoryle et active Smad2 et Smad3 qui forment un complexe avec Smad4 et régulent l'expression des familles Snail/ Slug, ZEB1/2 et Twist. Zeb1 à son tour diminue l'expression de miR-200. TGF-  $\beta$  active également d'autres voies de signalisation qui n'inclut pas les Smads, comme PI3K-Akt-mTOR(Katsuno et al., 2013).

Les divers miR jouent un rôle important dans le programme induisant la TEM. Par exemple l'expression de miR-200 est activée par le TGF- $\beta$ . MiR-200 bloque Zeb1/Zeb2. Le TGF- $\beta$  induit l'expression de miR-155 via Smad4. A noter que la diminution de miR-155 inhibe la TEM induite par le TGF- $\beta$  (Kong et al., 2008). Ainsi miR-302, miR-372 et miR-204 répriment l'expression de TβRII et inhibe la TEM (Subramanyam et al., 2011) (Wang et al., 2010). L'expression de miR-23a est régulée par le TGF- $\beta$ 1 de manière Smad-dépendante dans la lignée cellulaire humaine A549. La surexpression de miR-23a supprime l'expression de l'E-cadherine et stimule la TEM. Ainsi, l'inhibition de miR-23a supprime partiellement la TEM induite par le TGF- $\beta$  (Cao et al., 2012). Les BMP, qui sont connus pour induire l'expression de miR-200 et miR-205, sont capables d'inhiber la TEM et de favoriser la MET (Samavarchi-Tehrani et al., 2010).

Le TGF- $\beta$  active directement l'expression de l'E3 ubiquitine ligase HDM2, par la liaison du complexe Smad3/4 sur son promoteur. Il en résulte l'ubiquitylation et donc la

dégradation de p53, cela concourant avec la progression de la TEM. Le TGF- $\beta$  induit l'expression de Mdm2 (antagoniste de p53) lors de la TEM (Araki et al., 2010). Le TGF- $\beta$  induit l'expression du facteur de transcription Sox4 qui est nécessaire à l'induction de la TEM (Zhang et al., 2012a).

Les effets du TGF- $\beta$  sont variés en fonction du type cellulaire et des conditions. Le type cellulaire et l'environnement cytokinique dicte la nature de la réponse. L'abondance et la fonction des différents ligands, des récepteurs et des régulateurs du TGF- $\beta$  déterminent la nature et l'intensité du signal induit par le TGF- $\beta$ . Un déterminant majeur comporte les facteurs qui coopèrent avec les protéines SMAD pour réguler la transcription. La disponibilité des partenaires de SMAD détermine quels gènes seront ciblés, activés ou réprimés. L'environnement épigénétique de la cellule comprenant la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, le positionnement des nucléosomes, les ARN non-codants et d'autres composants induit la formation de la chromatine et dicte quels sont les gènes ouverts pour l'expression et donc susceptible à la régulation (Massagué, 2012).

Le TGF- $\beta$  est impliqué dans la suppression de l'activité anti-tumorale des LT, des NK, des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Ces cellules sont connues pour jouer un rôle important dans la régulation de la progression tumorale.(Li et al., 2006). Dans les pathologies cancéreuses, le TGF- $\beta$ 1 est plus abondant que le TGF- $\beta$ 2 ou le TGF- $\beta$ 3. L'expression du TGF- $\beta$ 1 est d'ailleurs souvent augmentée dans le cancer humain (Wojtowicz-Praga, 2003) (Levy and Hill, 2006). Lorsque le TGF- $\beta$  est exprimé et sécrété *in vivo*, il est séquestré dans la matrice extracellulaire (ECM) et fait parti d'un complexe inactif jusqu'à son activation (Stover et al., 2007). Une fois activé, le TGF- $\beta$  se lie avec le récepteur TGF- $\beta$  de type II (T $\beta$ RII;TGF- $\beta$ RII) et le ligand lié au T $\beta$ RII est capable de transactiver efficacement le récepteur de TGF- $\beta$  de type I (T $\beta$ RI; TGF- $\beta$ R1) (Deryck and Zhang, 2003)(Shi and Massagué, 2003).

Le ligand du TGF- $\beta$ 1 est surexprimé dans les cancers du sein, du côlon, de l'œsophage, de l'estomac, du foie, du pancréas, du poumon et de la prostate. Cependant, les mutations et la perte des récepteurs du TGF- $\beta$  de type I et de type II ont été détectées dans de nombreux cancers. La délétion, la mutation et la perte de l'expression de SMAD4 a été rapportée dans le cancer des voies biliaire, le cancer de la vessie, le cancer du sein, le cancer

du col de l'utérus, le cancer du côlon, le cancer du foie, le cancer de l'intestin, le cancer de l'œsophage, le cancer du poumon, le cancer de l'ovaire et les cancers pancréatiques. La mutation ou la perte de SMAD2 a été détectée dans le cancer du col de l'utérus, le cancer du côlon, le cancer du poumon et le cancer du foie. Cependant, SMAD3 a été maintenue dans la plupart des cancers communs (Grady and Markowitz, 2002), (Levy and Hill, 2006), (Bierie and Moses, 2006).

LE TGF- $\beta$  favorise le développement tumoral. Le blocage de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  spécifique des LT permet la génération d'une réponse immunitaire efficace et capable d'éradiquer des tumeurs chez les souris (Gorelik and Flavell, 2001) . Dans le micro-environnement tumoral les sources de TGF- $\beta$  sont multiples. Il a été montré récemment que les LTreg CD4 + CD25 + étaient une source majeure de TGF- $\beta$ . D'après cette étude, le TGF- $\beta$  n'inhiberait pas le développement de la population CTL CD8 +, mais favoriserait les fonctions effectrices des CTL (Chen et al., 2005). À l'heure actuelle, un certain nombre d'études ont clairement démontré que le TGF-  $\beta$  pouvait supprimer la différenciation des LT cytotoxiques (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2005), (Ranges et al., 1987). Le TGF- $\beta$  empêche également l'expression des granzyme A/B, des perforines, de FasL et de l'interféron-gamma qui favorisent la cytotoxicité des CTL (Thomas and Massagué, 2005), (Bierie and Moses, 2010).

Le TGF- $\beta$  peut supprimer la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2 et favoriser la différenciation des LTreg. Il implique l'inhibition des cellules CTL Th1 et Th2, tout en favorisant l'expansion des Treg. Le TGF- $\beta$  est un puissant chimio-attractif pour les NK, les monocytes et les MF. Il favorise la différenciation des monocytes en macrophages. Lorsqu'il est présent, le TGF- $\beta$  favorise le développement des cancers associés aux cellules NK, aux neutrophiles et aux MF (Bierie and Moses, 2010).

Le TGF- $\beta$  supprime l'activité cytolytique des cellules NK et inhibe leur sensibilité à l'interféron. Il réprime l'expression du CMH I et CMH II dans certaines populations cellulaires. La réduction de l'expression du CMH - I dépendante du TGF- $\beta$  entraîne la réduction de la lyse des cellules tumorales par les cellules NK (Ma and Niederkorn, 1995), (Bierie and Moses, 2010). La production de TGF- $\beta$  par les LTreg CD4 + CD25 + inhibe la cytotoxicité cellulaire des cellules NK dépendante du récepteur NKG2D et favorise la croissance et la dissémination tumorale (Ghiringhelli et al., 2005a)(Smyth et al., 2006). Une corrélation inverse a été établie

entre la sécrétion de TGF- $\beta$ 1 et l'expression du récepteur NKG2D chez les patients atteints d'un cancer. La faible expression du récepteur NKG2D, contribue à une réduction de la cytotoxicité des lymphocytes NK et permet la progression de la maladie (Lee et al., 2004).

Finalement, le TGF- $\beta$  est un facteur chimioattractif des polynucléaires neutrophiles. Il inhibe leur capacité à supprimer la croissance des cellules tumorales (Reibman et al., 1991). Une fonction prédominante des neutrophiles dans le microenvironnement tumoral est la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales exprimant le FasL. L'expression de FasL est une composante importante de l'inhibition des cancers, qui agit en induisant des signaux de mort dans les cellules exprimant le récepteur de Fas (Hahne et al., 1996). Le TGF- $\beta$  bloque la différentiation des macrophages induite par l'INF- $\gamma$ , ce qui inhibe la capacité des macrophages à tuer efficacement les cellules tumorales (Haak-Frendscho et al., 1990). Les MDSC sont connues pour être une source majeure de TGF-  $\beta$  et le recrutement accrue des MDSC est en corrélation avec l'augmentation de la production de TGF- $\beta$  in vivo (Yang et al., 2008a). Le TGF- $\beta$  stimule le recrutement des monocytes, des macrophages, des NK, des DC et des LT, tout en inhibant leurs fonctions antitumorales (Li et al., 2006) (Wrzesinski et al., 2007).

#### VEGF

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) induit la prolifération des cellules endothéliales, favorise la migration des cellules, et inhibe l'apoptose. In vivo, le VEGF induit l'angiogenèse ainsi que la perméabilisation des vaisseaux sanguins, et joue un rôle central dans la régulation de la vasculogénèse. La dérégulation de l'expression du VEGF contribue au développement des tumeurs solides par la promotion de l'angiogenèse tumorale. Par conséquent, l'inhibition de la signalisation du VEGF abroge le développement d'une grande variété de tumeurs. Les différentes formes du VEGF se lient à deux récepteurs de la tyrosine-kinase, VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (KDR/flk-1), qui sont exprimés presque exclusivement dans les cellules endothéliales. Ces dernières expriment en outre, les corécepteurs neuropilin-1 et neuropilin-2, qui se lient sélectivement à la forme 165 du VEGF. Le VEGF favorise aussi l'expression de Fas-L sur les cellules endothéliales et cela

provoque l'apoptose des LT CD8<sup>+</sup> lors du passage de la barrière endothéliale vers le tissu tumoral (Lee et al., 2015).

#### TNF-α

Le TNF-α (Tumor necrosis factor) joue un rôle pro et anti-tumorale par rapport au contexte. Le TNF-α, initialement découvert pour son activité antitumorale, a été montré comme l'un des principaux médiateurs de l'inflammation. Induit par une large gamme de stimuli pathogènes, le TNF-α induit d'autres médiateurs de l'inflammation. Le TNF-α est également produit par les tumeurs et peut agir comme un promoteur endogène de tumeur.

Le TNF-α est une cytokine multifonctionnelle qui joue un rôle important dans divers événements cellulaires tels que la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation et la mort. Le TNF-α exerce ses fonctions biologiques à travers l'activation de voies de signalisation distinctes telles que NF-κB et JNK. NF-κB est un signal anti-apoptotique, tandis que JNK contribue à la mort cellulaire et leur balance détermine la réponse à TNF-α.

Le TNF-α a deux récepteurs: TNFR1 (p55) et TNFR2 (p75). Lors de la liaison du TNF-α, qui est un homotrimère naturel, TNFR-1 forme un homotrimère pour recruter le TRADD (TNFR-associated death domain). TRADD constitue une plateforme de recrutement pour les protéines adaptatrices comme RIP (receptor interacting protein), TRAF-2 (TNFR-associated factor 2), FADD (Fas-associated death domain) servant à recruter les molécules clés responsables de la signalisation intracellulaire pour activer NF-κB et JNK.

Le TNF-α est impliqué dans l'angiogenèse, l'invasion et les métastases des cancers. Le TNF-α exogène ou produit par les macrophages accélère la TEM et ainsi contribue à la progression et l'invasion. Le TNF-α améliore l'invasion des cancers via l'induction des MMP - 2, 3, 9, 12, α2β1 intégrine et d'ICAM-1 (Bates and Mercurio, 2003)(Chuang et al., 2008) ICAM-1 (Myers et al., 1992).

## ICAM-1

Je traiterais les caractéristiques d'ICAM-1(InterCellular Adhesion Molecule), parmi les différentes molécules induites par TNF- $\alpha$ , comme dans le cadre de notre travail, nous avons observé son induction lors du traitement avec le TNF- $\alpha$ .

Structure d'ICAM-1: Le gène d'ICAM-1 (également connu sous le nom de CD54) se trouve sur le chromosome 19. La protéine ICAM-1 est une protéine membranaire hautement glycosylée de 80 à 114 kDa (selon le degré de glycosylation). Il se compose de cinq domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et une queue intracytoplasmique courte de 28 acides aminés (van de Stolpe and van der Saag, 1996). Cette glycoprotéine de surface cellulaire sert de ligand pour les  $\beta$ 2-intégrines, LFA-1 (CD11a/CD18) et Mac-1 (CD11b/CD18), qui sont exprimés par les leucocytes (Marlin and Springer, 1987)(Diamond et al., 1990), et pour la leucosialine (CD43) exprimée par les LT (Lymphocyte T) (Rosenstein et al., 1991).

Expression d'ICAM-1: ICAM-1 n'est pas exprimé dans les tissus normaux du cerveau, des nerfs périphériques, du pancréas, de l'ovaire, du sein, de l'utérus, du col utérin, de la prostate, du poumon, du larynx, de la moelle osseuse, du muscle strié, du cœur, du mésothélium, de l'oesophage, de l'intestin grêle , du côlon et du foie (Hayes and Seigel, 2009). Elle est surexprimée dans la rate et sur divers types de cellules: des globules blancs, des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules épithéliales et des cellules cancéreuses. Les dommages dans la structure de la molécule d'ICAM-1 ou des anomalies de son expression entraînent les mélanomes, les tumeurs lymphoïdes, myéloïdes, les désordres neurologiques, le rejet d'organes transplantés, l'ischémie, l'artériosclérose, l'asthme allergique, etc... (Grzelewski-Rzymowska and Pietrzkowicz, 2004)(Witkowska and Borawska, 2004).

Régulation et fonctions d'ICAM-1: ICAM-1 se retrouve sous forme de dimère à la surface des cellules humaines. Son rôle principal est l'induction d'une interaction menant à l'adhérence de deux cellules (Reilly et al., 1995). La queue intracytoplasmique d'ICAM-1 interagit avec des protéines associées au cytosquelette d'actine: l' $\alpha$ -actinine, l'ezrine, l'actine. Le remaniement du réseau d'actine sous-membranaire participe étroitement à l'activation des intégrines, dont le LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1).

L'engagement des molécules d'ICAM-1 avec les intégrines mobiles entraîne la formation des petits ou des gros amas de LFA-1, et cela favorise la consolidation de l'adhésion (Carpén et al., 1992)(Heiska et al., 1998).

Plusieurs signaux et facteurs de transcription : le NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), les JAK(Janus kinase) / STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), l'IFN-γ, l'AP-1 (activator protein-1), les MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et les PKC (Protein kinase C) sont impliquées dans la régulation d'ICAM-1 (Roebuck and Finnegan, 1999)(Rahman et al., 1999). Il existe une corrélation entre les niveaux accrus d'NF-κB nucléaire et la diminution d'ICAM-1 dans le cas du cancer buccal. En conséquence une résistance à la cytotoxicité médiée par les NK et les LT est observée dans ces tumeurs. Par contre, NF-κB peut servir comme un régulateur positif et négatif de l'expression d'ICAM-1 selon les stimulis. Par exemple, quand les cellules tumorales HEp2 (Human epidermoid cancer cells) sont traitées avec le TNF-α (tumor necrosis factor alpha), l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 est diminuée lorsque NF-κB est bloquée. Par contre, dans le cas de cellules traités avec l'IFN-γ (interferon gamma), l'expression d'ICAM-1 est augmentée lorsque NF-κB est bloqué. Et le traitement des cellules tumorales avec la combinaison de TNF-α et d'IFN-γ conduit à une activation synergique d'ICAM-1. Cette combinaison augmente également l'expression du CMH-I (major histocompatibility complex) sur les cellules tumorales, ce qui conduit à l'inhibition de la fonction des cellules NK (Jewett et al., 2003).

D'après Gorgoulis et ses collègues, l'inhibition de NF-κB n'empêche pas l'induction d'ICAM-1 par p53 suite aux dommages de l'ADN. Cela montre que la régulation d'ICAM-1 par p53 est NF-κB-indépendante. Après le traitement avec l'inhibiteur spécifique de p53 : PFT-α ,(pifithrin α) l'induction d'ICAM-1 est supprimée. En même temps, l'expression d'ICAM-1 est abrogée dans les lignées déficientes pour p53. L'induction artificielle de p53 augmente l'expression d'ICAM-1 au niveau de l'ARNm et au niveau protéique, ainsi que l'expression des cibles classiques de p53 comme p21, MDM-2(mouse double minute 2 homolog). Lors du séquençage d'ICAM-1, trois éléments de réponse (dont deux fonctionnels) pour p53 situés sur le premier et le deuxième intron d'ICAM1 ont été révélés (Gorgoulis et al., 2003). ICAM-1 est surexprimé dans les cellules sénescentes, les tissus âgés (Minamino et al., 2002), et p53

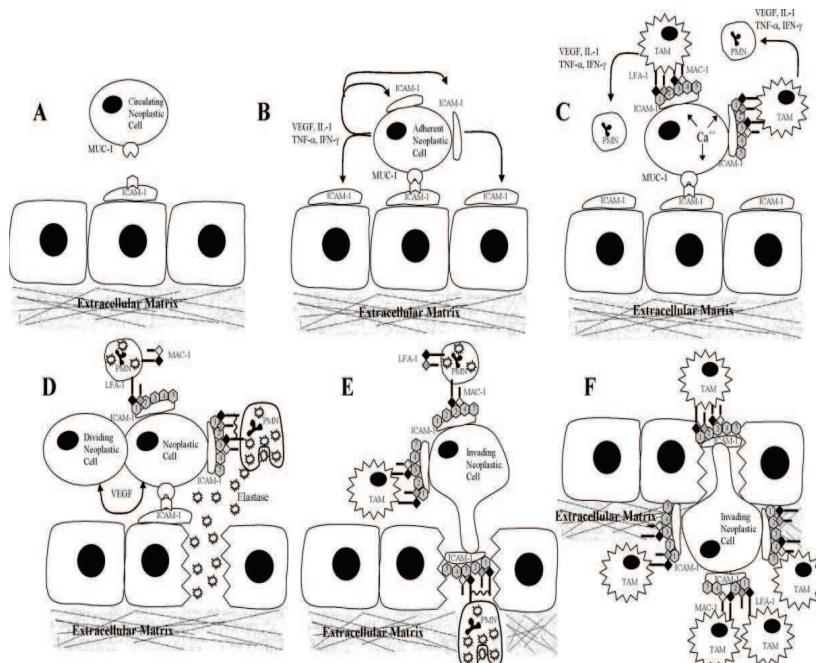
est aussi impliqué dans le processus de vieillissement (Tyner et al., 2002). La sénescence cellulaire et le vieillissement peuvent représenter un lien supplémentaire entre p53 et ICAM-1.

Allingham et ses collègues ont décrit le rôle d'ICAM-1 dans la migration des leucocytes. L'engagement d'ICAM-1 dans les cellules endothéliales conduit à l'activation de deux tyrosines kinases : Src et Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2). Les formes actives de ces kinases sont recrutées aux sites de liaison d'ICAM-1 et induisent la phosphorylation de la VE-cadhérine aux tyrosines 658 et 731 correspondant aux sites de liaison de p120-caténine et de β-caténine. Ainsi, l'engagement d'ICAM-1 aboutit à la diminution de la liaison de p120-caténine et de β-caténine avec VE-cadhérine. Cette perte de liaison des caténines entraîne une perte locale de l'intégrité des jonctions, ce qui facilite le passage paracellulaire des leucocytes. L'activation de Pyk2/Src endothérial, ainsi que la phosphorylation de la VE-cadhérine au Y658 et Y731 sont donc nécessaires pour la migration transendothelial des leucocytes (Allingham et al., 2007).

Il y a aussi des travaux qui décrivent l'expression d'ICAM-1 comme un facteur de mauvais pronostique dans le cas des cancers. Selon ces études, les résidus tyrosines Y474 et Y485, localisés dans la queue intracytoplasmique de l'ICAM-1, sont responsables du clivage d'ICAM-1 par des protéases et entraîne la présence d' ICAM-1s (ICAM-1 soluble) dans la circulation sanguine (Tsakadze et al., 2004). ICAM-1s inhibe la réponse immunitaire et diminue la migration des leucocytes vers les tissus périphériques. La sécrétion élevée d'ICAM-1s par les cellules cancéreuses bloque la reconnaissance de ces cellules par les LT et leur permet d'échapper au système immunitaire. Donc, via cette immunosuppression, ICAM-1s induit la progression du cancer et des métastases (Grothey et al., 1998). Les concentrations élevées d'ICAM-1s circulant ont été associées à la présence de métastases hépatiques dans le cancer de l'estomac, du côlon, du pancréas, de la vésicule biliaire et à une faible survie dans le mélanome malin (Velikova et al., 1997). Dans le cas de diverses inflammations, des infections et des maladies malignes, on retrouve aussi des niveaux élevés d'ICAM-1s dans le sérum des patients.

Voici un autre modèle décrivant ICAM-1 comme un mauvais facteur. Les cellules de tumeurs solides via MUC-1 (Mucin-1) se lient à ICAM-1 sur les cellules endothéliales. Cette

liaison déclenche l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 sur les tumeurs et favorise la libération de substrats chimioattractifs pour les macrophages circulants. Ensuite, les macrophages attirés se lient à ICAM-1 exprimé par les cellules tumorales, en provocant la propagation d'autres cytokines et chimiokines qui recrutent les neutrophiles. Une adhérence étroite entre les ligands des neutrophiles et l'ICAM-1 des tumeurs induit la dégranulation des neutrophiles. Les élastases libérées suite à la dégranulation brisent les barrières endovasculaires et endolymphatiques, et permettent ainsi la migration transendothéliale des cellules tumorales. Par conséquent, l'expression d'ICAM-1 par la cellule tumorale conditionne leur potentiel métastatique (Roland et al., 2007) .



**Figure 6 : La migration trans-endothéliale des cellules tumorales.**

(A) Les cellules tumorales circulantes se lient via MUC-1 à l'ICAM-1 des cellules endothéliales. (B) Cette liaison libère du calcium qui induit la libération des cytokines et des chimiokines, qui elles attirent les macrophages, et induit ainsi l'auto-régulation de l'ICAM-1 des tumeurs. (C) Les macrophages associés aux tumeurs produisent des cytokines pour promouvoir l'expression d'ICAM-1 et ainsi attire les PMNs (polymorphonuclear neutrophiles) qui s'adhèrent fortement à l'ICAM-1 des cellules tumorales. (D) L'adhérence étroite de LFA-1/Mac-1 (macrophage adhesion ligand-1) des PMNs avec ICAM-1 de tumeur permet le cross-linking des ligands et active PMNs pour libérer des élastases. (E) Les élastases brisent les barrières endovasculaires et endolymphatiques (F) permettant la migration transendothéliale des cellules tumorales et l'expression élevée de TAM (tumor-associated macrophage) (Roland et al., 2007).

## **B. LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES EN TEM**

La capacité de transition des cellules épithéliales vers les cellules mésenchymateuses d'une façon partielle ou totale illustre une plasticité inhérente au phénotype épithéial. Au cours de la TEM, les cellules épithéliales perdent leurs jonctions et la polarité apicale-basale, réorganisent leur cytosquelette, subissent un changement dans les programmes de signalisation qui définissent la forme des cellules et reprogramment l'expression des gènes. Selon le tissu et les contextes de signalisation, les cellules épithéliales peuvent perdre seulement quelques-unes de leurs caractéristiques et présenter des propriétés épithéliales et mésenchymateuses en même temps, ce qui est nommé TEM partielle (Lamouille et al., 2014). L'implication des diverses voies de signalisation aboutissant à la surexpression ou à la translocation nucléaire de facteur de transcription comme la  $\beta$ -caténine ou des molécules de la famille de Snail, de Zeb, de la HBH etc. détermine si la TEM sera partielle ou complète.

### **Notch**

La voie de signalisation Notch est impliquée dans l'induction de la TEM par l'hypoxie. La voie Notch induit HFA-1a (hypoxia-inducible factor 1a) et le recrutement au niveau du promoteur de la LOX; et l'augmentation de la LOX stabilise la protéine Snail-1 (Sahlgren et al., 2008) (Sumual et al., 2010). La stimulation des récepteurs Notch dans les cellules épithéliales du pancréas induit la TEM (Bao et al., 2011). Dans le cancer du sein et de la prostate, l'expression de Notch-1 est trouvée dans les tumeurs invasives accompagnées de l'expression de Vimentine et de Zeb1 (Sethi et al., 2010).

## Wnt

La voie canonique de Wnt est responsable de l'accumulation de  $\beta$ -caténine. La transduction du signal Wnt commence avec des ligands se liant au récepteur du Fz (Frizzled). Fz lie à LRP-5/6 (lipoprotein receptor-related proteins 5/6) et recrute la protéine DSH (Dishevelled). DSH phosphoryle GSK3 qui permet l'accumulation de la  $\beta$ -caténine. Ensuite la  $\beta$ -caténine passe dans le noyau où elle se lie avec TCF / LEF (T-cell and lymphoid enhancer factors). Le complexe TCF / LEF se fixe sur le promoteur de ZEB1. Dans la voie non-canonique de Wnt, le récepteur du Fz lié au ligand recrute DSH qui forme un complexe avec DAAM1 (Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1). DAAM1 active ensuite la protéine Rho qui active ROCK. ROCK est un régulateur de la structure du cytosquelette et aboutit à un changement au niveau de l'adhésion cellulaire (MacDonald et al., 2009).

## Akt

AKT est un proto-oncogène et une kinase de sérine / thréonine associé à plusieurs cancers. AKT inhibe des protéines et des enzymes clés dans les voies pro-apoptotiques, bad et caspase- 9, augmentant ainsi la durée de vie cellulaire. Ces protéines protègent les cellules de l'apoptose lors de mutations ou d'autres événements perturbant la signalisation cellulaire. L'inhibition de ces protéines permet aux cellules d'échapper à l'apoptose et d'augmenter leur potentiel néoplasique. Lors de la TEM, il peut être possible d'observer une activation d'AKT (Larue and Bellacosa, 2005).

## C. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUES EN TEM

La perte fonctionnelle de la protéine des jonctions adhérentes l'E-cadhérine, est caractéristique de la TEM. Les principaux groupes de facteurs de transcription qui se lient au promoteur de l'E-cadhérine et répriment directement sa transcription sont Snail, ZEB, (familles ZFH) et Twist (famille bHLH) (Kalluri and Weinberg, 2009)(Thiery et al., 2009). Mais la famille GSC réprime l'expression de E-cadhérine via les autres facteurs de transcription activant la TEM (Hartwell et al., 2006)(Thuault et al., 2006).

### Zeb

Plusieurs voies de signalisation (TGF- $\beta$ , Wnt, Notch, TNF- $\alpha$  / IL1b, récepteurs tyrosine kinase, etc) induisant Snail et Twist activent également ZEB1 et ZEB2 (Dave et al., 2011). La famille ZEB est constituée de deux membres : ZEB1 et ZEB2. Ils contiennent plusieurs domaines pour intéragir avec d'autres FT (Gheldorf et al., 2012)(Sánchez-Tilló et al., 2011a).

Plusieurs travaux ont montré le rôle de ZEB1 et de ZEB2 dans l'induction de TEM (Grooteclaes and Frisch, 2000)(Comijn et al., 2001)(Aigner et al., 2007)(Vandewalle et al., 2005). La protéine ZEB se lie à des co-répresseurs de CtBP (C-terminal-binding protein) qui à leur tour recrutent des histone-désacétylases et méthyltransférases, polycomb et coREST(Liu et al., 2008). Zeb1 et Zeb2 sont aussi capables d'induire la TEM via leur effet répresseur sur les miRs. Les MiRs (micro RNA) régulent l'invasion et la formation de métastases en ciblant un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation de TEM/ MET. Les membres de la famille miR- 200 ( miR-200a/b/c , miR- 141 et miR -429 ) maintiennent un état épithélial par l'inhibition de ZEB1 et de ZEB2 (Christoffersen et al., 2007)(Park et al., 2008)(Gregory et al., 2008) (Brabertz and Brabertz, 2010). À son tour, Zeb1 réprime miR- 200; il existe donc une double boucle négative qui maintient les cellules soit dans un état épithélial, soit dans un

état mésenchymateux (Brabertz and Brabertz, 2010) (Burk et al., 2008)(Bracken et al., 2008)(Mizuguchi et al., 2012). Les cellules cancéreuses qui forment des métastases macroscopiques ont des niveaux plus élevés de miR-200 par rapport à celles qui envahissent mais qui ne sont pas capables de coloniser et de former des métastases, suggérant un rôle important de la réversion de la TEM dans la formation de métastases macroscopiques. Paradoxalement, la surexpression de miR-200 dans des lignées cellulaires de cancer du sein chez la souris favorise la formation de métastases au niveau des poumons et du foie par l'inhibition de Sec23a (sécrétome qui bloque la colonisation métastatique) (Dykxhoorn et al., 2009)(Korpal et al., 2011). Dans les lignées épithéliales, l'expression de miR- 200 est éteinte par hyperméthylation pendant la TEM induite par le TGF-β, mais revient à la MET par déméthylation. De même, les îlots 50CpG de miR-200 sont hyperméthylés dans les carcinomes primaires, mais restent non méthylés dans les cellules épithéliales de la muqueuse du colon normal.

La surexpression de miR-200a diminue significativement CD133/1+, la migration et l'invasion des cellules. Le 3'-UTR (three prime untranslated region) du mRNA de Zeb1 (répresseur transcriptionnel de E cadherine) est directement régulé par miR-200a. Lors de l'induction de miR-200a dans les cellules CD133+/1, l'expression de Zeb1 est diminuée au niveau protéique et de l'ARNm, et aboutit donc à l'induction de E-cadherine. Ainsi, la perte de miR-200a joue un rôle important dans la suppression de E-cadherine par Zeb et par ce moyen augmente la migration et l'invasion des cellules CD133/1+ (Wu et al., 2011).

HIF-1α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha), les cytokines inflammatoires, l'activation des récepteurs de tyrosines kinases (Smit and Peepoer, 2011)(Krishnamachary et al., 2006), Ras-ERK2-FRA1, NF-κB, et JAK/STAT3 (Chua et al., 2007)(Shin et al., 2010)(Xiong et al., 2012), les hormones de croissance et les stéroïdes (Chamberlain and Sanders, 1999)(Richer et al., 2002)(Kumar et al., 2010) induisent ZEB1 et ZEB2. La voie Wnt canonique (Sánchez-Tilló et al., 2011b), et la voie Notch activent également l'expression de ZEB1 (Wang et al., 2009b)(Brabertz et al., 2011). L'induction de ZEB1 par la voie Notch implique NF-κB (Wang et al., 2009b). ZEB1 est réprimée au niveau du promoteur par GRH-2 (Grainyhead -like 2) qui est un facteur de transcription co-régulé avec la E-cadhéline (Cieply et al., 2012). Le gène Six1 induit ZEB1 et la TEM par la répression de miR- 200 (Ono et al., 2012). En revanche, p53

inhibe le phénotype mésenchymateux et la capacité invasive des cancer du sein, du pancréas et des hépatocarcinomes par induction du miR- 200 et du miR- 192 pour réprimer ZEB1 et ZEB2 (Chang et al., 2011a)(Kim et al., 2011b)(Pinho et al., 2011). Mais la forme mutée de p53 diminue le miR- 200 et augmente l'expression de ZEB1 (Chang et al., 2011a). ZEB réprime miR- 183 et miR-203 , qui, avec miR- 200, inhibe l'expression de facteurs souches comme Bmi1 , Sox2 et Klf4 (Wellner et al., 2009)(Shimono et al., 2009). miR -221 et miR- 222 diminuent TRPS1 (trichorhinophalangeal 1), qui à son tour inhibe ZEB2 (Stinson et al., 2011). En revanche, dans les cellules endothéliales , ZEB2 est la cible directe de miR -221 (Chen et al., 2010). L'hormone de croissance induit ZEB2 via NAT (natural antisense transcript) (Kumar et al., 2010). Cela montre que les miRs peuvent avoir des fonctions différentes, voire opposées, selon le type de cellule.

ZEB1 est fortement exprimé par les cellules cancéreuses invasives de nombreuses tumeurs, comme le cancer colorectal (Peña et al., 2005)(Peña et al., 2006)(Aigner et al., 2007)(Sánchez-Tilló et al., 2011b) (Spaderna et al., 2006) , le cancer du sein (Soini et al., 2011) (Graham et al., 2010), l'hépatocarcinome (Zhou et al., 2012), le cancer gastrique (Okugawa et al., 2012), le cancer de la vessie (Sayan et al., 2009)(McConkey et al., 2009)(Kenney et al., 2011)(Choi et al., 2012), le cancer du poumon (Dohadwala et al., 2006) (Gemmill et al., 2011), le cancer de la prostate (Graham et al., 2008), le cancer du pancréas (Wellner et al., 2009) (Kurahara et al., 2012) (Arumugam et al., 2009), et le cancer de l'utérus (Spoelstra et al., 2006) (Singh et al., 2008). L'expression augmentée de ZEB2 été détectée dans la plupart des carcinomes exprimant ZEB1.

### **Twist**

Le gène Twist encode pour les protéinés Twist1 et Twist 2, dont l'expression est impliquée dans la progression de nombreux cancers. Le domaine bHLH de Twist 1 et de Twist 2 sert à sa fixation sur l'ADN et à l'homo / hétéro-dimérisation. La fixation de Twist sur les promoteurs de ses gènes cibles peut activer l'expression des protéines comme N-cadhérine , AKT2 ou Gli1, mais peut aussi réprimer l'expression des protéines comme E-cadhérine (Alexander et al., 2006)(Cheng et al., 2007a). Mais la régulation de l'expression de certains

gènes par Twist est dépendante de sa liaison avec d'autres régulateurs de la transcription. Par exemple dans certains cas, la répression médiée par Twist consiste à sa liaison avec d'autres facteurs de transcription pour inhiber leur activité (par exemple, Runx2 , myogénique bHLH , NF-κB , et p300/pCAF ). Pour la répression de la E-cadhérine, l'interaction de Twist1 avec le complexe NURD (Nucleosome Remodeling Deacetylase) est nécessaire (Fu et al., 2011).

L'expression de Twist lui-même peut être influencée par divers facteurs : Twist est induit par le TGF-β, Wnt , l'hypoxie, l'activation des récepteurs tyrosines kinases (Franco et al., 2011) (Qin et al., 2012). EGF et IL6 induisent Twist1 via l'activation de la signalisation JAK / STAT et par la liaison directe de STAT3 au promoteur de Twist1 (Lo et al., 2007)(Cheng et al., 2008). NF-κB active Twist qui activé se lie à son tour aux promoteurs du TNF-α et de l'IL-1β qui bloque l'activité transcriptionnelle de NF-κB. Il existe donc, une boucle de régulation négative entre Twist et NF-κB (Šošić et al., 2003). L'induction de Twist1 par HIF -1 dans des conditions hypoxiques joue un rôle important dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse (Yang et al., 2008b). La phosphorylation par PKA (protein kinase A) favorise l'hétérodimérisation de Twist1 avec E12 et Hand2 et stabilise la protéine Twist 1 (Firulli et al., 2005) (Lander et al., 2011). La surexpression de let -7d inhibe l'expression de Twist1 dans les cancers oraux (Chang et al., 2011b).

Divers miRs peuvent aussi influencer l'expression de Twist. Twist1 est inhibée par miR- 29b , miR- 580 , miR- 214 (Nairismägi et al., 2012)(Ru et al., 2012)(Li et al., 2012a). A son tour Twist1 active l'expression de miR- 10b , miR- 199a et miR- 214 via la fixation sur leurs promoteurs (Ma et al., 2007)(Lee et al., 2009).

Plusieurs études ont décrit Twist comme un facteur de transcription impliqué dans l'induction de la TEM. Twist augmente la prolifération tumorale, la formation de métastases et bloque la sénescence par l'induction de la TEM (Yang et al., 2004)(Puisieux et al., 2006) (Ansieau et al., 2008) (Weinberg, 2008) (Ansieau et al., 2010). L'incidence élevée de CTCs (ciculating tumor cells) exprimant Twist et la Vimentine chez les patients au stade métastatique par rapport à des cancers du sein de stade précoce confirme l'idée de l'implication de la TEM dans le potentiel métastatique des CTCs (Kallergi et al., 2011).

Certains effets de Twist1 sur la TEM sont médiés par l'activation de la transcription de Snail 2 via la fixation de Twist1 au promoteur de Snail2 (Casas et al., 2011). L'inhibition de Snail1 diminue Twist1 au niveau de la protéine et de l'ARNm (Dave et al., 2011). Par contre il a aussi été montré que Snail1 est capable de réprimer la transcription de Twist1 (Tran et al., 2011).

L'expression de Twist est corrélée avec l'invasion, la formation de métastases, l'agressivité des cancers et une faible survie (Tran et al., 2011) (Yang et al., 2009) (Terauchi et al., 2007)(Song et al., 2006) (Kajiyama et al., 2006) (Hosono et al., 2007) (Niu et al., 2007) (Yan-Qi et al., 2007) (Sasaki et al., 2009).Twist1 est surexprimé par de nombreux cancers, comme le cancer colorectal (Valdés-Mora et al., 2009), le cancer du sein (Yang et al., 2004) (Soini et al., 2011) (Martin et al., 2005)(Ansieau et al., 2008)(Mironchik et al., 2005) les hépato-carcinomes (Yang et al., 2009) (Niu et al., 2007) (Lee et al., 2006b), le cancer gastrique (Yan-Qi et al., 2007)(Rosivatz et al., 2002), le cancer de la vessie (Zhang et al., 2007), le cancer de la prostate (Kwok et al., 2005) (Yuen et al., 2007), le cancer endométrial (Kyo et al., 2006), le cancer du pancréas (Ohuchida et al., 2007) et le cancer ovarien (Kajiyama et al., 2006) (Hosono et al., 2007), le mélanome (Hoek et al., 2004).

### **Snail**

Snail 1 et Snail 2 (Slug) reconnaissent les motifs « E-box » du promoteur de l'E-cadhérine. Snail1 est un facteur transcriptionnel responsable de la répression de la transcription du gène codant pour E-cadhérine et ZO-1. L'expression forcée de Snail induit la TEM. En plus de la E-cadhérine, Snail diminue d'autres marqueurs épithéliaux tels que desmplakin 15, la mucine épithéliale Muc-1 et la cytokératine-18. Ainsi, Snail induit les marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine et la fibronectine. Ces changements ne peuvent pas être la conséquence de la seule perte de l'E-cadhérine, car la transfection avec un cDNA codant pour l'E-cadhérine n'est pas suffisante pour induire un retour à une morphologie épithéliale. Cela indique que Snail a des cibles supplémentaires indépendantes de la E-cadhérine (Nieto, 2002).

Des sites de liaison de Snail1 sont détectés spécifiquement dans le promoteur d'E-cadhérine, CLDN7 (claudin-7), KRT 8 (cytokeratin-8). En l'absence de LSD1, Snail1 ne parvient pas à réprimer E-cadhérine. Snail recrute une histone déméthylase LSD1 (KDM1A) au niveau du promoteur des gènes épithéliaux et LSD1 supprime la diméthylation de la lysine4 au niveau de l'histone 3 (H3K4m2). Les niveaux de H3K4m2 dans le promoteur de l'E-cadhérine sont corrélés avec la transcription de l'E-cadhérine. L'expression de Snail1 conduit à une diminution spécifique de H3K4m2 au niveau de ses autres cibles. Ainsi, les promoteurs CLDN7 et KRT8 exposent moins de H3K4m2 dans les cellules exprimant Snail1 (Lin et al., 2010).

L'expression post-traductionnelle de Snail est sous contrôle de l'activité kinase de la GSK3 $\beta$  qui induit l'ubiquitylation et la dégradation de Snail par le protéasome. GSK3 $\beta$  est inhibée lors de l'activation des voies Akt et Wnt, ce qui aboutit à l'activation de Snail. L'activation de la voie de signalisation Wnt canonique stabilise la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme, ce qui la rend disponible pour une liaison avec les facteurs de transcription TCF / LEF. Par la suite, cet ensemble subit la translocation vers le noyau où il régule l'expression de leurs gènes cibles. Au contraire, des niveaux élevés d'E-cadhérine provoquent la séquestration de la  $\beta$ -caténine pour former des complexes d'adhérence à la membrane cellulaire. Ainsi, la signalisation FGF favorise la signalisation Wnt en diminuant les niveaux de E-cadhérine par le maintien de l'expression de Snail (Nieto, 2002). Snail est aussi activé par la voie TGF- $\beta$ /Smad (Peinado et al., 2007).

DDX3 (DEAD box protein 3) favorise la rétention de Snail dans le noyau pour soutenir son accumulation et par ce moyen induit la progression tumorale. DDX3 agit en s'associant avec GSK3 $\beta$  (régulateur négatif de Snail). La diminution de l'expression de DDX3 diminue le niveau basal de Snail et induit l'expression de E-cadherine ; sa surexpression induit la TEM. Par conséquence, il y a augmentation de l'adhésion cellulaire et diminution de capacité proliférative et migratoire des cellules (Sun et al., 2011).

L'expression de Snail est induite lors de traitements avec les inhibiteurs de HDAC classe I et II (TSA, VPA, NaBu), mais pas avec les inhibiteurs de HDAC III. Les inhibiteurs de HDAC peuvent causer des dommages à l'ADN, ainsi l'expression de Snail peut être influencée par d'autres agents induisant des dommages à l'ADN comme la camptothécine. La

camptothécine induit aussi l'augmentation du niveau nucléaire de p53, par contre l'augmentation de l'expression de Snail par la camptothécine n'est pas médiée par p53 (Sun et al., 2011).

Snail1 avec Smad3/Smad4 réprime E-cadhérine (Vincent et al., 2009). La surexpression de Snail1 diminue la liaison d'AKT1 au promoteur de l'E -cadhérine (Villagrasa et al., 2012). La phosphorylation de Snail1 par GSK3 $\beta$  l'inactive fonctionnellement (Zhou et al., 2004). L'interaction de Snail1 avec LOXL2 (lysyl oxidase-like 2) et LOXL3 (lysyl oxidase-like 3) empêche sa dégradation induite par GSK3 $\beta$  (Peinado et al., 2005b), mais qui est favorisée par la phosphorylation par CK1e (casein kinase 1) (Xu et al., 2010). La dégradation des Snails d'une manière indépendante de la GSK3 $\beta$  passe par sa liaison avec FBXL14 (F-box and leucine-rich repeat protein 14) (Lander et al., 2011)(Vernon and LaBonne, 2006)(Viñas-Castells et al., 2010), ou par l'ubiquitination par Mdm2 dans le cas de Snail2 (Wang et al., 2009a).

Les facteurs de transcription Snails sont induits par TGF- $\beta$ , Notch , TNF- $\alpha$  , EGF , FGF , Wnt , Shh , SCF / c-kit , l'hypoxie , et les œstrogènes (Thiery et al., 2009). L'activation de Snail1 par TGF- $\beta$  nécessite une interaction entre R-Smads et HMGA2 (high mobility group AT-hook 2) (Thuault et al., 2008). Dans certains types de cancers, l'induction de Snail1 par le TGF- $\beta$  nécessite simultanément la signalisation Ras (Horiguchi et al., 2009) et la signalisation Notch qui conduisent à l'activation directe de son promoteur ; ainsi il peut stabiliser Snail1 par l'activation de LOX (lysyl oxidase) via HIF -1a (Sahlgren et al., 2008). L'hypoxie, les cytokines inflammatoires, la voie NF- $\kappa$ B par AKT induisent l'activité transcriptionnelle de SNAIL1. L'induction de NF- $\kappa$ B par les cytokines inflammatoires stabilise Snail1 en inhibant son ubiquitination par GSK3 $\beta$  (Wu et al., 2009b). L'engagement des récepteurs de tyrosine kinases comme COX2/PGE2(Cyclooxygenase-2/Prostaglandin E2) induit également l'expression de Snail1 par l'inhibition de la GSK3 $\beta$  (Dohadwala et al., 2006). Snail1 est activé au niveau de la traduction par YB-1 (Y-box binding protein 1) (Evdokimova et al., 2009). Snail1 est également capable de réprimer sa propre transcription (Peiró et al., 2006).

Snail peut aussi avoir des effets sur l'expression d'autres facteurs de transcription impliqués en TEM. Snail1 améliore la stabilité de TWIST1 et déclenche la translocation nucléaire d'Ets1 qui active le promoteur de ZEB1. Snail1 réprime aussi miR-200, pour

augmenter l'expression des ZEB (Dave et al., 2011) (Beltran et al., 2008) (Guaita et al., 2002) (Shirakihara et al., 2007).

Quant au rôle des miRs dans la régulation des Snails, l'expression de Snail1 et Snail2 (et ZEB1) réprime la transcription de miR-34a/b/c, donc, Snail et mir34 forme une double boucle négative (Siemens et al., 2011)(Kim et al., 2011a). miR34a inhibe les facteurs souches comme Bmi1 , CD44 , CD133 (Siemens et al., 2011). Les membres de la famille miR-30 ciblent aussi Snail1 (Kumarswamy et al., 2012) (Zhang et al., 2012b) et la surexpression de miR-30 et de miR- 34 empêche la TEM induite par le TGF-β. miR-34 vise également plusieurs gènes de la voie Wnt comme Wnt1 , Wnt3 , LEF1 et β-caténine , ce qui suggère que la perte d'activité de p53 pourrait être accompagnée de l'activation de la signalisation β-caténine/TCF. En effet, p53 diminue l'expression de Snail1 et Snail2 par l'induction de miR-34a/b/c. (Cha et al., 2012). Let-7d (lethal-7d) et miR-29b diminue aussi l'expression de Snail1 (Chang et al., 2011b)(Ru et al., 2012). miR-1 et miR-200 inhibent l'expression de Snail2 et ils sont aussi réprimés par la liaison de Snail2 à leurs promoteurs (Liu et al., 2013). Snail2 est également inhibée par miR-203 qui est surexprimée dans les tumeurs primaires et inhibée ou éteinte dans les lignées métastatiques par hyperméthylation (Zhang et al., 2011).

L'induction de Snail2 est essentielle pour l'induction de la TEM par Twist1. Une diminution de Snail2 par phosphorylation bloque complètement la capacité de Twist2 à réprimer la transcription de l'Ecadherine (Molina-Ortiz et al., 2012). Twist 1 a besoin de Snail2 pour supprimer la branche épithéliale du programme de TEM et ainsi promouvoir la TEM et la formation de métastases des cancers (Casas et al., 2011). Snail2 active également ZEB1 par liaison directe à son promoteur (Wels et al., 2011). L'induction de Snail2 par le TGF-β dépend de la régulation négative de KLF4 (kruppel-like factor 4) et FOXA1 (forkhead box A1) qui forment une double boucle répressive avec Snail2 (Liu et al., 2012).

Snail1 est surexprimé dans plusieurs types de cancers comme le cancer du sein (Moody et al., 2005)(Cheng et al., 2001)(Zhou et al., 2004) (Soini et al., 2011) (Elloul et al., 2005) (Côme et al., 2006) (Martin et al., 2005)(Blanco et al., 2002) (Geraldts et al., 2011), le cancer colorectal (Francí et al., 2009)(Peña et al., 2005)(Bezdekova et al., 2012)(Roy et al., 2005), le cancer gastrique (Rosivatz et al., 2002), le cancer du poumon (Yanagawa et al., 2009), le cancer ovarien (Imai et al., 2003) (Elloul et al., 2005) (Blechschmidt et al., 2008), le

cancer du pancréas (Hotz et al., 2007), les hépatocarcinomes (Sugimachi et al., 2003) (Miyoshi et al., 2005) et les sarcomes synoviaux (Saito et al., 2004).

Snail2 est aussi surexprimée dans plusieurs types de cancers comme le cancer du sein (Côme et al., 2006) (Elloul et al., 2005)(Martin et al., 2005), le cancer colorectal (Shioiri et al., 2006)(Peña et al., 2005)(Blechschmidt et al., 2008), le cancer gastrique (Castro Alves et al., 2007), le cancer du poumon(Sivertsen et al., 2006) (Shih et al., 2005), le cancer ovarien (Elloul et al., 2005) (Elloul et al., 2006), et le cancer du pancréas (Hotz et al., 2007).

**Tableau 1 : Principaux FT de la TEM et leurs cibles.**

Les cibles de Zéb	E-cadhérine	Marqueur épithéial	Répression	(Sánchez-Tilló et al., 2011)		
	MMP1					
	Crumbs3					
	PATJ					
	HUGL2					
	Mucin					
	Occludin					
	Epiplakin & Periplakin					
	Desmocollin-2					
	EpCAM					
Les cibles de Snail	famille de miR-200	Inhibiteur de la TEM	Induction	(Kaufhold and Bonavida, 2014)		
	Vimentine	Marqueur mésenchymateux				
	RKIP	Suppresseur de tumeur				
	PTEN					
	E-cadhérine					
	Occludine					
	Claudins					
	Mucine-1					
	Cytokeratin 18					
	ZEB-1	Facteur de transcription de la TEM				
Les cibles de Twist	Vimentine	Marqueur mésenchymateux	Induction	(Di Maro et al., 2014)		
	Fibronectine					
	MMP-2/MMP-9					
	LEF-1					
	HS6ST2					
	LEPREL1					
	PDZK1IP1					
	PDZK1					
	ID4					
	KRT7					

### Elf5

Le facteur de transcription Elf5 (E74-like factor 5) est un membre de la famille des Ets (E twenty-six domain transcription factor). La perte d'Elf-5 conduit à la TEM et l'induction des facteurs clés de ce processus comme Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2 et Snail2. Le traitement avec le TGF-β aboutit à la perte d'E-cadherine dans les cas de lignées qui n'expriment pas Elf-5. L'expression forcée d'Elf-5 bloque l'induction de plusieurs gènes et facteurs de transcription mésenchymateux par le TGF-β comme la Vimentine, Slug, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2. Elf5 a donc un rôle inhibiteur de la TEM, qui renforce le phénotype épithéial. Ainsi, la surexpression de Elf-5 induit l'expression de plusieurs marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine, la β-cathénine, ZO-1 et affecte négativement l'invasion, la formation de métastases. La MET induite par Elf5 est médiée par la répression directe de Slug. Slug est un des facteurs de transcription qui régule les propriétés des cellules souches acquises lors de la formation des MaSCs (mammary stem cells) et des CSCs (cancer stem cells). La surexpression de Elf5 diminue l'activité des MaSC, de manière réversible par la surexpression de Slug (Chakrabarti et al., 2012).

### SIRT1

SIRT1 (silent information regulator 1) est recruté par ZEB1 pour réprimer le promoteur de l'E-cadhérine. SIRT1 est aussi capable d'induire Zeb et Snail, mais il n'a pas d'effet sur Twist (Byles et al., 2012). Il existe une boucle de rétrocontrôle négative entre SIRT1 et miR- 200a (qui inhibe ZEB) (Eades et al., 2011).

### Sox4

Sox4 ( SRY(sex determining region Y)-related HMG-box ) est augmentée dans plusieurs types de cancers et son induction contribue à la TEM. Sox4, via sa liaison avec la β-caténine régule la signalisation Wnt. Sox4 régule d'une façon directe l'expression de Ezh2 qui code pour le H3K27Me3. L'ablation de l'expression de Ezh2 (Enhancer of zeste homolog 2)

entrave l'induction de la TEM et son expression forcée restaure la TEM dans les cellules déficientes pour Sox4. Sox4 dans le cancer du sein coopère avec l'oncogène Ras. Ezh2 peut induire la TEM et augmente le potentiel métastatique dans le cancer de la prostate. L'ablation de Sox4 s'observe avec la diminution de Snail1, Snail2, Zeb1, Zeb2 et Twist1. Pourtant les promoteurs de ces facteurs de transcription ne montrent aucun changement au niveau de H3K27Me3 (tri-methylation of lysine 27 on histone H3) lors de la TEM et ils ne sont pas affectés suite à la déplétion du Ezh1/2 (Tiwari et al., 2013).

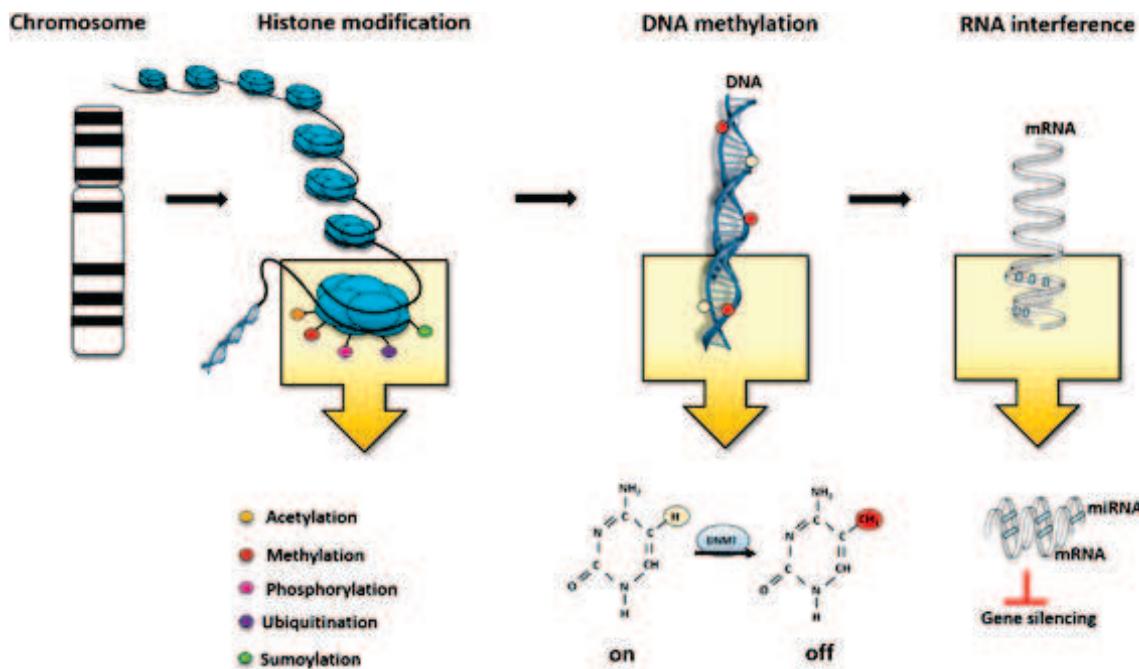
## **D. REGULATIONS EPIGENETIQUES DANS LA TEM**

La reprogrammation épigénétique au cours de la TEM est médiée par de vastes changements dans les modifications de la chromatine. Dans les cancers, E-cadhérine peut être réprimée par hyperméthylation, par implication de divers miRs, par modification de l'expression de petites GTPases ou des récepteurs de la matrice extracellulaire, etc. Cela aboutit à la TEM (Iorio and Croce, 2012). Ainsi que, via des changements épigénétiques, l'absence de signaux inducteurs de la TEM, la réexpression de certains ensembles de miRs et la régulation négative de facteur de transcription activant la TEM, les cancers subissent la MET pour pouvoir former une tumeur secondaire sur le site des micro-métastases (Brabietz et al., 2001)(Brabietz, 2012).

### **Les principaux modes de régulations épigénétiques**

L'épigénétique est l'étude des changements de l'activité des gènes, en l'absence de modification de la séquence d'ADN, et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires (Fincham, 1997). Contrairement aux mutations génétiques qui affectent la séquence d'ADN, les modifications épigénétiques sont réversibles. La chromatine, double hélice d'ADN enroulée autour de protéines de structure, telles que les histones, définit le degré de compaction des chromosomes dans le noyau des cellules. L'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription dépend du niveau plus ou moins important de compaction de la chromatine. Celle-ci peut être soit ouverte (euchromatine), permettant ainsi l'accès à la machinerie transcriptionnelle et à l'expression génique, soit fermée (hétérochromatine), empêchant ainsi l'expression d'un gène. Le maintien de l'état chromatinien est dépendant des (Cheung et al., 2000a) (Berger, 2007) :

- modifications post-traductionnelles des protéines d'histones,
- méthylations des cytosines de l'ADN,
- petits ARN d'interférence.



**Figure 7 : Mécanismes de régulation épigénétique.**

Schéma des modulations épigénétiques représentées par la modification des histones, méthylation de l'ADN et l'ARN interférence. Les modifications des histones via acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation sont spécifiques au site et réversible (Ciechomska et al., 2014).

#### a) Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont des protéines (organisées en nucléosome) en structure octamère autour desquelles s'enroule l'ADN. Un octamère d'histone est un complexe protéique composé de doublets de molécules d'histone H2A, H2B, H3 et H4, sur lesquelles l'histone H1 vient se fixer après enroulement de l'ADN. La première structure de compaction de la chromatine nommé « collier de perle » est obtenue via la succession des nucléosomes le long de la molécule d'ADN. Les protéines histones elles-mêmes sont sensibles à plusieurs modifications post-traductionnelles:

- Méthylation: l'action du groupe méthyle au niveau des résidus lysines pour les positions K9 et K27 entraîne généralement une fermeture de la chromatine en favorisant l'enroulement de l'ADN autour des histones, mais la méthylation en position K4 et K36 est associée à un état ouvert de la chromatine retrouvé au niveau

des promoteurs de gènes exprimés (Zhang and Reinberg, 2001)(Lachner and Jenuwein, 2002).

- Acétylation : l'action chimique sur les lysines entraîne généralement une ouverture de la chromatine, permettant ainsi la transcription. Mais elle est facilement réversible grâce à l'action des histones désacétylases (HDAC) (Roth et al., 2001).
- Phosphorylation : l'addition d'un groupe phosphate chargé négativement peut perturber les interactions électrostatiques entre les bases d'histones et le squelette de l'ADN chargé négativement, et ainsi augmenter l'accessibilité du génome à des facteurs nucléaires. Les multiples processus cellulaires sont associés avec la phosphorylation des histones. Par exemple, la phosphorylation de H3, H2A.X, et H2B est liée avec : la stimulation mitogène (transcription), la condensation des chromosomes (mitose), les dommages de l'ADN et l'apoptose en fonction des sites de phosphorylation (Cheung et al., 2000b)
- Ubiquitylation : modification post-traductionnelle par l'ubiquitine qui joue un rôle central dans le ciblage des protéines pour la dégradation protéolytique par le protéasome. L'ubiquitylation peut servir aussi en tant que signal de reconnaissance pour des facteurs fonctionnellement pertinents à la transcription. Elle peut aussi fonctionner de manière synergique en association avec d'autres modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation (Jason et al., 2002). Il existe aussi plusieurs protéines analogues à l'ubiquitine, qui peuvent également se lier et modifier la fonction des protéines, par exemple SUMO (small ubiquitin-related modifier).
- SUMOylation: La sumoylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. SUMOylation a été montré pour sa capacité à modifier de manière covalente un grand nombre de protéines avec des rôles importants dans l'expression génique, la structure de la chromatine, la transduction du signal, et le maintien du génome. La machinerie enzymatique qui ajoute et supprime SUMO est semblable, mais distincte de la machinerie d'ubiquitylation (Gill, 2004).

*b) La méthylation de l'ADN*

La méthylation de l'ADN est une modification chimique des carbones 5 des cytosines de l'ADN. La méthylation des cytosines est associée à la répression de leur expression si elle est localisée au niveau de la région promotrice des gènes (Suzuki and Bird, 2008). La méthylation des cytosines est catalysée par des enzymes appelées DNMT (DNA Methyl Transferases). Certaines de ces enzymes, comme les DNMT3a/b, sont responsables de la méthylation, tandis que d'autres, comme DNMT1, ont un rôle de maintien des profils de méthylation (Reik et al., 2001). Chez l'Homme, la méthylation des cytosines est indispensable au développement et à la survie des embryons par son implication dans des processus de régulation majeurs tels que la régulation des gènes, l'inactivation du chromosome X et les empreintes génétiques (Morgan et al., 2005).

*c) Les petits ARN*

Les petits ARN, de 20 à 29 nucléotides, agissent en séquestrant ou en dégradant les ARN messagers, permettant une répression de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Les petits ARN comme siRNA (small interfering RNA), miRNA (micro RNA), piRNA/ rasiRNA (PIWI-interacting RNA/ repeat associated small interfering RNA), endo-siRNA (endogenous-siRNA) sont impliqués dans différentes voies de régulation, ainsi ils interviennent pour cibler des modifications épigénétiques sur certaines séquences répétées.

### III. L'IMMORTALISATION DES CELLULES CANCEREUSES

Comparée à une cellule normale, une cellule tumorale subit une sélection préférentielle en terme de maintenance des télomères, de prolifération, de survie et de résistance à la mort cellulaire induite par apoptose.

#### A) Activation de la télomérase.

La télomérase, l'enzyme qui ajoute les répétitions d'ADN télomérique aux extrémités de chromosome, est un acteur clé de l'oncogenèse. Le mécanisme de prolifération illimité des cancers implique les télomères qui protègent l'extrémité des chromosomes des phénomènes de dégradation. L'activation de la télomérase dans les cellules cancéreuses est requise pour permettre la croissance à long terme des cellules transformées et leur capacité de réPLICATION illimitée.

##### Télomérase

Les télomérases sont des ribonucléoprotéines (assemblage d'ARN et de protéines), découverte par Elizabeth Blackburn et Carol Greider en 1985. Elles permettent le maintien de la longueur des télomères lors de la réPLICATION de l'ADN en ajoutant des séquences TTAGGG aux extrémités des chromosomes (Greider and Blackburn, 1985) (Morin, 1989).

La télomérase humaine se compose de deux sous-unités (Bollmann, 2013):

- hTERT (Telomerase reverse transcriptase): une enzyme à activité transcriptase inverse, qui assure la synthèse de la séquence télomérique en utilisant l'ARN comme matrice.

- hTERC (Telomerase RNA component) : un ARN structuré de 451 nucléotides comportant plusieurs régions en tige et boucles et un pseudo-nœud. Une des boucles de ce pseudo-nœud contient la séquence qui sert de matrice à la synthèse de la répétition télomérique.

Sans l'action des télomérases (qui remettent la partie perdue à chaque division cellulaire), le chromosome perdrait les informations de ses gènes au bout d'une quarantaine de divisions et la cellule mourrait. Ainsi, quand les extrémités télomériques sont trop courtes (limite d'Hayflick), les signaux de dommage à l'ADN des télomères entraînent l'arrêt des divisions cellulaires et l'induction de l'apoptose. Par contre, les cellules capables de maintenir une taille critique de leurs télomères peuvent échapper à l'apoptose et devenir immortelles (Hayflick, 1965) .

L'activité de la télomérase est constatée dans 80-90% des cellules cancéreuses en accord avec son rôle dans l'immortalisation cellulaire et la tumorigénèse. Environ 15% des cancers et des lignées cellulaires cancéreuses dérivées ne montrent pas d'activité de télomérase, mais ils utilisent une voie alternative d'allongement des télomères (Bollmann, 2013). Ainsi, certaines cellules cancéreuses contournent le mécanisme de sénescence par l'inactivation des gènes de point de contrôle du cycle cellulaire, comme p53.

## *B) Perte de la sénescence.*

Les télomères sont au cœur du contrôle de la sénescence. Le raccourcissement des télomères, et en particulier la taille des télomères les plus courts, est le moteur de la mise en place de la sénescence.

### Sénescence

La sénescence est une partie du programme de vieillissement cellulaire pouvant être divisée en 2 types : sénescence réplicative et sénescence précoce. La sénescence cellulaire est un processus biologique normal pour supprimer les dommages irréversibles causés par

des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Par ce moyen, il empêche la transmission des dommages aux cellules filles.

La sénescence est un processus positif médié par les voies impliquant des suppresseurs p53, et p16INK4A/pRb (Ferbeyre et al., 2002) (Narita et al., 2003). Le phénotype de sénescence comprend l'expression de SA- $\beta$ -galactosidase(SA- $\beta$ -gal), l'augmentation de l'expression de p16INK4a qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire et à l'augmentation de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires SASP (senescence-associated secretory phenotype). Les cellules sénescantes ont été observées dans le vieillissement normal et dans les cellules / tissus de diverses pathologies liées à l'âge (Sabin and Anderson, 2011). Lors d'une SASP, un certain nombre de chimiokines et de cytokines attirent et activent les cellules du système immunitaire. Les cellules sénescantes expriment également des ligands pour les cellules immunitaires cytotoxiques telles que les NK(natural killer), donc le système immunitaire peut cibler spécifiquement les cellules sénescentes et les tuer *in vivo* (Campisi et al., 2011).

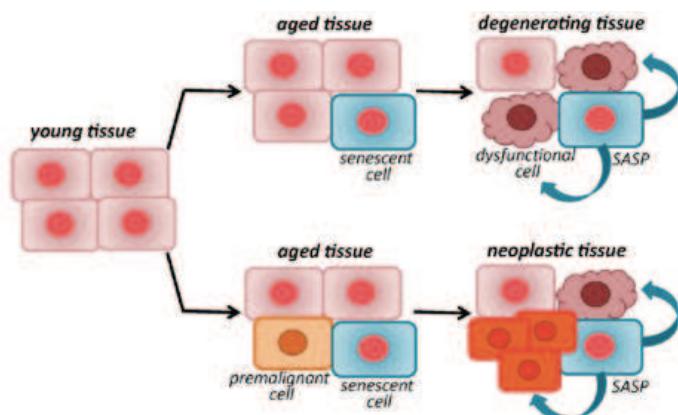


Figure 8 : SASP peut favoriser un phénotype malin et la croissance tumorale.

Les cellules sénescantes et néoplasiques augmentent avec l'âge dans de nombreux tissus. Lors de SASP, les cellules sénescantes peuvent promouvoir à la fois les maladies dégénératives et néoplasiques du vieillissement. La SASP peut également causer la prolifération des cellules précancéreuses voire favoriser la transition vers un phénotype invasif (Campisi et al., 2011).

La SASP est un puissant inducteur de la TEM, une étape cruciale dans le développement d'un carcinome invasif et métastatique. Cette activité est principalement due aux facteurs composants de la SASP comme l'IL-6, l'IL-8 et GRO (growth-related oncogene) (Campisi et al., 2011).

La sénescence induite par AKT est dépendante de p53 et requiert mTORC1 qui intervient directement dans la régulation de la translation, dans le contrôle de la translocation nucléaire de p53 et l'inactivation de MDM2 (Astle et al., 2012).

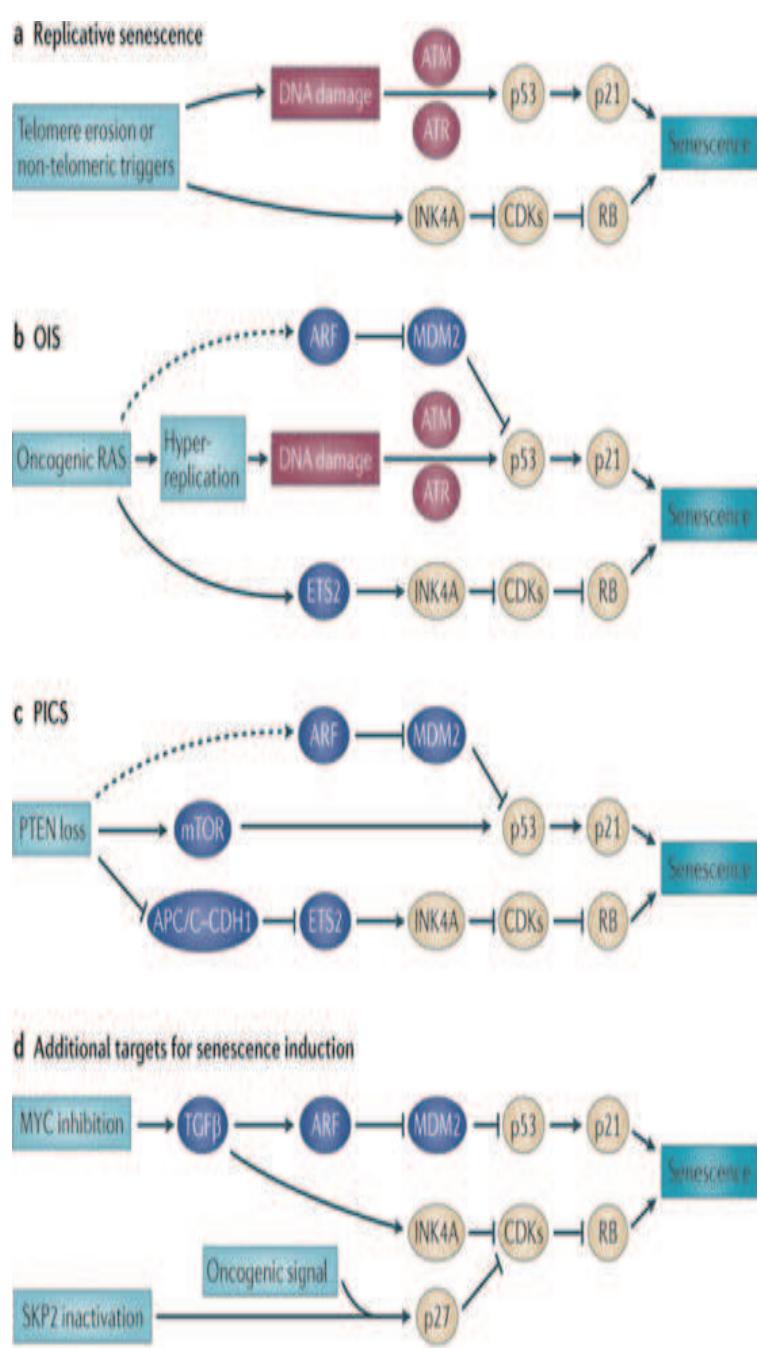


Figure 9 : Diverses classes de sénescence.

a) Sénescence réplique, b) OIS (Oncogene-induced senescence), c) PICS (PTEN loss-induced cellular senescence).

Bleu : les effecteurs en amont, Rouge : transducteurs des dommages de l'ADN, Jaune : les effecteurs en aval.

La sénescence réplique est entraînée par l'érosion des télomères et peut aboutir à l'activation de INK4A (également connu sous le nom de p16) ou peut déclencher les voies de lésion de l'ADN aboutissant à l'induction de p53 (a). En OIS, l'activation de la p53 passe par deux mécanismes principaux. Tout d'abord, il est stabilisé par la phosphorylation par DDR (DNA damage réponse) et ensuite par la stabilisation mediée par ARF. La flèche en pointillé est utilisée pour souligner le fait que, l'ARF est un facteur important pour l'induction de sénescence dans des cellules de souris, il ne semble pas avoir un rôle crucial dans un contexte humain (b). En revanche, l'induction de p53 dans PICS est principalement médier par des mécanismes de translation contrôlées par mTOR. En plus, la voie ETS2 - INK4A est également nécessaire pour l'induction de sénescence. La signalisation RAS-MAPK favorise directement l'activité de ETS2. L'activation de ETS2 via PICS se produit grâce à la déréglementation de la dégradation de ETS2 par le APC/C-CDH1 (CDH1-containing anaphase-promoting complex) (c). L'induction de sénescence peut également être atteint en ciblant les inhibiteurs principaux de la sénescence. Par exemple, l'inactivation

de MYC peut conduire à la restauration de la voie TGF- $\beta$  aboutissant à la sénescence. L'inhibition de SKP2 (la phase S kinase -associated protein 2) en association avec les autres événements oncogéniques (par exemple, l'activation de RAS ou la perte de PTEN) peuvent également conduire à la sénescence (Nardella et al., 2011).

Plusieurs études ont attribué la sénescence cellulaire à l'activation de p53. Par exemple, la sénescence induite par la perte de PTEN a été abrogée chez les souris déficientes en p53 et la sénescence induite par l'oncogène Ras a été observée dans les tumeurs hépatiques via la réactivation de p53 (Nardella et al., 2011)

### C) Inactivation de p53.

La rupture des points de contrôle du cycle cellulaire est également un des mécanismes conduisant à l'immortalisation des cellules. Dans les cellules normales, il y a une forte probabilité pour que l'expression de TERT soit réprimée par des gènes suppresseurs de tumeur comme p53. Ainsi, l'inactivation de p53 qui est un régulateur négatif du cycle cellulaire, aboutie au développement de différents cancers (Yao et al., 2012).

Comme mentionné précédemment, une autre caractéristique des cellules tumorales est leur capacité à résister à l'apoptose. Comme la protéine p53 joue un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose lors des mutations, alors la perte de fonctions de p53 aboutit à la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose.

#### p53

Les dommages à l'ADN, l'hypoxie ou l'anoxie, l'activation d'oncogènes, un manque en ribonucléotides, l'érosion des télomères peuvent activer l'expression de p53 connue sous le nom de « gardien du génome » (Evan and Vousden, 2001). Quand p53 est activée, elle agit sur ses gènes cibles, ce qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose, à la réparation de l'ADN et à la sénescence (Dupont et al., 2004). La protéine p53 est une protéine anti-oncogène, codée par un gène localisé sur le bras court du chromosome 17. La protéine p53 a une durée de vie de 15 à 20 minutes pour éviter la mort des cellules saines. Mais suite aux lésions de l'ADN, il y a une accumulation temporaire de p53 (Chernov et al., 1998).

### Régulation de p53:

MDM2 est le principal régulateur négatif de p53. Il existe une boucle de rétrocontrôle entre MDM2 et p53. Mais p53 est un facteur de transcription pour MDM2 qui induit son expression. En retour, MDM2 se fixe sur p53 et inhibe son activité transcriptionnelle ou induit sa dégradation de manière ubiquitine-dépendante (Stommel and Wahl, 2005). Les nutlines sont des analogues de cis-imidazoline découvertes par Vassiliev qui activent p53 en inhibant l'interaction entre MDM2 et p53 (Vassilev et al., 2004).

L'expression ectopique des miR-25, miR-30d, miR-504, miR-33, miR-380, miR-1285 diminue l'expression de p53 au niveau protéique et aboutit à la diminution de l'apoptose et à l'augmentation du potentiel souche. Il y a aussi des miRs dont l'expression aboutit à l'induction de p53. L'expression ectopique de miR-449 active p53 par suppression de SIRT1. miR-29 est inducible par p53 et il cible l'expression des régulateurs négatifs de p53 comme CDC42 et p85 $\alpha$  (sous-unités régulatrices de PI3K). p53 induit miR-192, miR-194 et miR-125 qui inhibent l'expression de son principal régulateur négatif MDM2 d'une façon directe (Hermeking, 2012).

p53 mutée forme des hétérotétramères avec p53wt et inhibe la capacité de p53 à agir comme un suppresseur de tumeur. p53 mutée peut exécuter certaines fonctions par régulation de l'expression des miRs aussi. La forme mutante de p53 diminue l'activité transcriptionnelle de miR-223 dans le cancer du sein et du colon dont l'expression est corrélée à la mort induite par les traitements par chimiothérapie dans les cellules exprimant la p53 mutée (Masciarelli et al., 2014).

### p53 et apoptose:

L'expression des récepteurs de mort DR4 et DR5 est régulée par p53. Le traitement avec Nutlin-3 active le promoteur de DR5 et augmente son expression protéique. Lors de co-traitements avec Nutlin3 et TRAIL, il y a induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses exprimant p53wt (Hori et al., 2010).

Les cellules qui ont subi une TEM sont connues pour avoir une résistance accrue à l'apoptose. CD95/Fas est un récepteur d'induction d'apoptose exprimé sur de nombreux

tissus et cellules tumorales. Au cours de la progression tumorale, Fas est souvent diminué et les cellules tumorales perdent la sensibilité à l'apoptose extrinsèque. miR-200c sensibilise les cellules à l'apoptose induite par Fas. L'inhibiteur d'apoptose FAP-1 est une cible pour miR-200c. miR-200c inhibe l'expression de l'inhibiteur d'apoptose FAP1 (FAS-associated phosphatase 1), et donc régule l'expression membranaire de Fas. Cette inhibition est responsable de la diminution de la sensibilité à l'apoptose médiée par Fas (Schickel et al., 2010).

L'induction de Fas peut également être dépendante de p53, en effet les éléments de réponse de p53 ont été identifiés dans le premier intron du gène Fas (Müller et al., 1998) (Munsch et al., 2000). L'inactivation de p53 bloque l'induction de Fas par certaines chimiothérapies (Longley et al., 2004).

STAT1 est également un régulateur important de l'expression de Fas (Xu et al., 1998). En revanche, aucun élément de réponse à STAT1 n'a été identifié dans le promoteur de Fas (Cheng et al., 1995). L'induction de gènes cibles de p53, tel que Fas, a été rapportée comme étant réduite dans des cellules déficientes en STAT1 (Townsend et al., 2004). Le traitement avec le CPT-11 ou le tomudex induit la phosphorylation de Stat1 dans les cellules négatives pour p53, mais pas dans les cellules avec p53wt. La présence d'un siRNA anti-Stat1 empêche l'expression membranaire de Fas en réponse au traitement avec le CPT-11 et le tomudex, mais n'altère pas son expression au niveau du gène. Donc Stat1 pourrait réguler l'expression de gènes impliqués dans le trafic de Fas à la surface cellulaire en réponse au CPT-11 ou au tomudex (McDermott et al., 2005).

p53 est aussi capable d'induire l'expression de NF-κB (Bohuslav et al., 2004)(Schneider et al., 2010). L'expression de p53 induit RSK1 (serine/threonine kinase ribosomal S6 kinase 1) qui à son tour induit la phosphorylation de RelA à la sérine 536. La transfection des cellules négatives pour p53 (Saos-2) avec la forme mutée et sauvage de p53 montre que p53wt active des gènes dépendants de p53 et de RelA, par contre la p53 mutée est capable d'activer uniquement des gènes dépendants de NF-κB et échoue à activer les gènes dépendant de p53. La capacité de p53 à activer NF-κB sans affecter la transcription des gènes dépendants de p53 montre que p53 s'engage directement dans la voie de signalisation qui induit l'expression de NF-κB et n'affecte pas l'expression des IkBs (Bohuslav

et al., 2004). La diminution de p53 bloque la fixation de RelA sur l'intron de DR5, ce qui montre la coopération entre p53 et p65 dans la régulation de RelA. Aussi, le traitement avec les inhibiteurs de HDAC active NF-κB et p53 et induit ainsi l'expression de DR5 (Shetty et al., 2005). La sous-unités p52 de NF-κB est ou sont aussi capable(s) de moduler l'activité promotrice des gènes cibles de p53. Le recrutement de NF-κB2 est dépendant de p53, et NF-κB2 coopère avec p53 pour réguler l'expression des cibles de p53 comme DR5, PUMA, Chk1, Gadd45 α (Schumm et al., 2006).

DDX3 est un inhibiteur de l'apoptose extrinsèque mediée par les DR. La surexpression de DDX3 augmente l'accumulation de p53 dans le noyau suite aux dommages à l'ADN. DDX3 est aussi impliqué dans l'apoptose intrinsèque, dans laquelle l'activation de la Caspase 7 est régulée par DDX3 d'une façon dépendante du statut de p53. La diminution de DDX3 s'accompagne d'une diminution de l'accumulation de p53 dans les cellules p53wt. Par contre, la déplétion de DDX3 ne modifie pas l'accumulation de p53 stabilisée par l'inhibition des protéases (Sun et al., 2013b).

#### p53 comme gardien du génome :

Les cinq principaux processus de réparation de l'ADN sont : le NER (Nucleotide-Excision Repair), le BER (Base-Excision Repair), le MMR (Mis Match Repair), le NHEJ (Non-Homologous End-Joining) et la recombinaison homologue HR ( Homologous Recombination). La protéine p53 contrôle plusieurs de ces processus, ainsi, il n'est pas surprenant qu'une perte de fonction de p53 résulte en une instabilité génomique (Sengupta and Harris, 2005). Lorsque des mutations de l'ADN sont présentes en grand nombre dans une cellule, la protéine p53 arrête momentanément le cycle cellulaire afin de permettre à la cellule de réparer ses lésions. La protéine p21, activée par p53, contrôle la transition de la phase G1 à la phase S du cycle. En se fixant sur les complexes cycline E/CDK2 et cycline D/CDK4(6), p21 inhibe leur activité en bloquant la progression du cycle cellulaire, tard en phase G1 et juste avant l'entrée en phase S (Carvajal et al., 2005). Lorsque les mutations sont trop nombreuses pour être réparées, la protéine p53 oriente la cellule vers l'apoptose (Vassilev, 2005). Pour faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule signale son état apoptotique à son environnement, par l'externalisation de phosphatidylsérines (Vance and Steenbergen, 2005). Les principales voies de l'apoptose, intrinsèque et extrinsèque,

mènent à l'activation des caspases. La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée via les récepteurs de mort qui possèdent dans leur structure un domaine de mort (Death Domain) qui permet la transmission du signal apoptotique (Vermeulen et al., 2005). La voie intrinsèque ou mitochondriale, implique plusieurs protéines de la famille Bcl-2. La famille Bcl-2 comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques, telles que Bax, Bak, Bid, Bad et Bcl-X<sub>s</sub>, qu'anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-XI (Yu and Zhang, 2005).

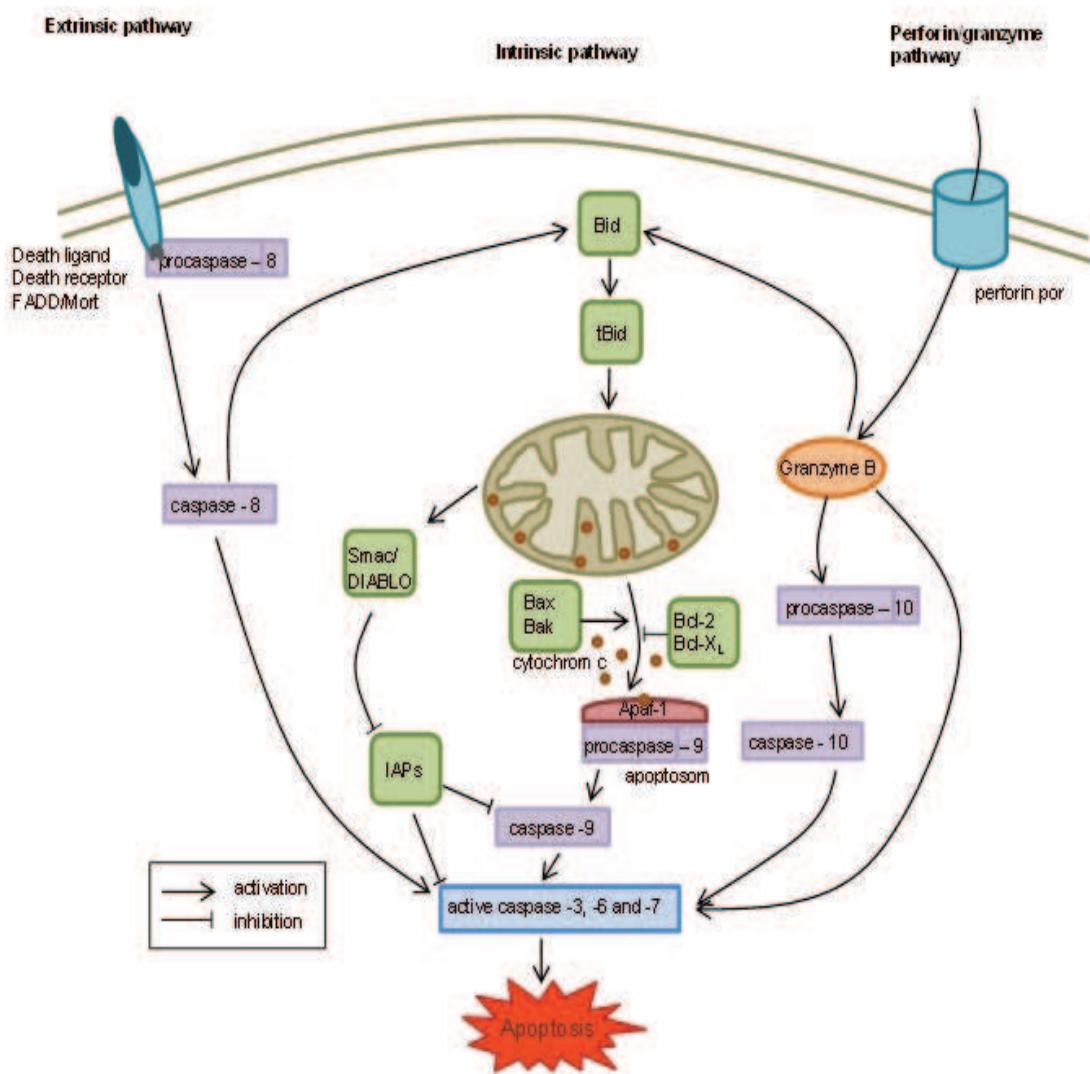


Figure 10 : Interactions et diversités des voies de signalisation de l'apoptose.

La cascade des caspases peut être activée par l'apoptosome, les récepteurs de mort ou par le granzyme B. Les caspases initiatrices -8, -9 ou -10, directement ou par l'intermédiaire des protéines spécifiques, déclenchent les caspases effectrices -3, -6 ou -7, ce qui conduit à la mort cellulaire (Kulbacka et al., 2012).

Il existe une autre voie d'apoptose additionnelle, la voie perforine-granzyme qui implique une cytotoxicité mediée par les LT. Cette voie converge vers la même voie

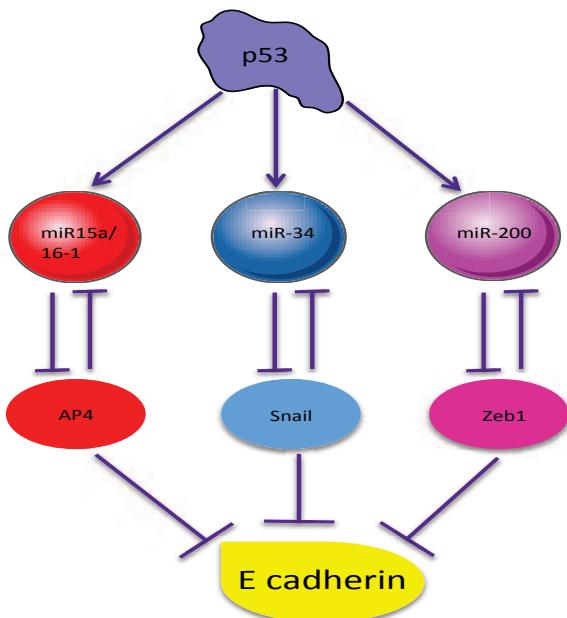
terminale d'exécution que les voies extrinsèque ou intrinsèque. Les voies extrinsèque, intrinsèque et perforine/granzyme nécessitent l'activation de leurs signaux initiateurs propres (caspase 8, 9 et 10) pour démarrer la cascade d'évènements moléculaires conduisant à l'apoptose et à l'activation de la caspase 3. Seul le granzyme A fonctionne de façon indépendante de la caspase 3 (Wang and El-Deiry, 2008)

p53 dans la TEM :

La diminution de p53 par shRNA ciblant p53 induit une TEM stable qui s'observe avec l'augmentation de Zeb1, de Snail, de la Vimentine, de la N-cadhérine et la diminution de la E-cadhérine (Chang et al., 2011a). La suppression de p53 augmente aussi la translocation nucléaire de la beta-caténine (Cagatay and Ozturk, 2002), mais le blocage de la beta-caténine avec XAV939 abroge l'induction de la TEM par la suppression de p53 (Wang et al., 2013). Lors du traitement avec le TGF-β, la diminution de l'expression de p53 induit le phénotype de TEM et les propriétés souches. Ainsi, l'augmentation de p53 dans ce modèle est suffisante pour réverser cette TEM. Mais, l'effet de la p53 sur la TEM est dépendant de son stade. Par exemple, dans les modèles de TEM induite par Snail, l'expression ectopique de p53 n'altère pas le cycle cellulaire ni la sénescence induite (Chang et al., 2011a).

p53 a une relation étroite avec plusieurs inducteurs de la TEM comme NRP2, Twist, TGF-β, Zeb1, Zeb2, Snail, Slug, c-met, DEK, AP-4.... Par exemple, p53 a un effet inhibiteur sur la TEM induite par Twist. Twist, par interaction directe avec p53 s'oppose aussi aux fonctions de p53 dans le cancer de la prostate et du sein (Shiota et al., 2008). La diminution de p53 dans les cellules NMuMG induit la TEM en réponse au TGF-β. La stabilisation de p53wt par traitement avec la Nutline a un effet négatif sur l'induction de la TEM. Ainsi, l'activation de p53 inhibe la TEM induite par le TGF-β (Termén et al., 2013). Les membres de la famille de miR- 200 et de miR-192 activés par p53, diminuent l'expression de Zeb1 et de Zeb2 qui sont les inducteurs de la TEM. La diminution de l'expression de ces miRs affecte la TEM par l'altération de l'expression de Zeb1 et de Zeb2 (Kim et al., 2011b). La perte de p53 dans les cellules épithéliales induit aussi la diminution de l'expression de miR-200 et active le programme de la TEM qui est réversible (montré par la diminution de la N-cadhérine et de BMI1) par l'activation de la voie p53-miR200c (Chang et al., 2011a). L'induction de p53 empêche la TEM induite par Snail en augmentant l'expression de miR-34 connu pour son

rôle négatif sur Snail. La perte de p53 dans le cancer du côlon, le cancer du sein et dans le carcinome pulmonaire, active la TEM Snail-dépendante par diminution de miR-34 (Kim et al., 2011a). L'expression ectopique de miR-34 est capable de réverser la TEM (Siemens et al., 2011) par diminution de Snail et aussi d'empêcher l'induction de la TEM par le TGF- $\beta$ . miR-34 est aussi capable de diminuer l'expression de Slug et de Zeb1, ainsi que l'expression des facteurs souches comme BMI1, CD44, CD133, OLFM4 et de c-MYC. Mais Snail et Zeb1 sont capables de se fixer sur les E-box du promoteur de miR-34 et ainsi de diminuer son expression. (Wang et al., 2013). p53 est capable de dégrader Slug dans le cancer du poumon grâce à la formation de complexes p53-MDM2-Slug (Wang et al., 2009a). p53 mutée altère la morphogenèse des MDCK (Madin-Darby canine kidney) via la promotion de la TEM par l'expression de c-met, qui s'accompagne de l'augmentation de l'invasion (Zhang et al., 2013). DEK avec les oncogènes E6 et E7 peut promouvoir la TEM *in vitro* et *in vivo* lorsqu'il est surexprimé. Le rôle oncogénique de DEK est médié par sa capacité à inhiber l'activité de p53. Le statut de p53 est important dans la diminution de DEK en réponse à la Nutlin-3 ou à la fludarabine (Wang et al., 2012). L'expression de AP4 est diminuée lors de dommages à l'ADN par p53 d'une façon indirecte via les miR-15a et miR-16-1. AP4 est la cible directe de c-MYC et l'inducteur de la TEM mediée par c-MYC dans les cancers colorectaux. L'expression ectopique de miR-15a/16-1 est suffisante pour réverser la TEM (s'observe par l'induction de E-cadhérine au niveau de l'ARN et de la protéine) via la diminution de l'expression de AP4 et pour supprimer les métastases pulmonaires dans le modèle des xénogreffes. Mais AP4 est aussi capable de supprimer l'expression de miR-15a/16-1 d'une façon directe. Cela montre qu'il y a une double boucle de rétrocontrôle négatif entre AP4 et miR-15a/16-1. AP4 est aussi le répresseur de l'expression de p21. L'inactivation de p53 et de DLEU2 change l'expression de AP4 et aboutit à l'induction de la TEM et à la formation des métastases. A l'inverse, l'activation de p53 est suffisante pour diminuer l'expression de AP4. Mais l'analyse CHIP-Seq révèle que AP4 n'est pas la cible directe de p53 (Shi et al., 2014).



**Figure 11 : p53 empêche l'induction de la TEM via divers miRs.**

P53 induit les différents miRs, qui jouent un rôle négatif sur les facteurs impliqués dans l'induction de la TEM. Par ces moyens, p53 renforce la stabilité de l'expression de E-cadhérine, dont la répression est suffisante pour déclencher de nombreuses voies de signalisation conduisant à la TEM.

miR-15a/16-1 sont aussi impliqués dans l'inhibition de la prolifération des cellules souches dans le cancer du sein (Polytarchou et al., 2012) et la suppression de l'angiogenèse par ciblage du VEGF (Sun et al., 2013a). Dans les modèles de tumeurs, obtenus par la diminution de p53, l'augmentation importante de la formation des vaisseaux sanguins a été observée par rapport aux modèles de tumeurs gardant l'expression de p53. L'expression de Semaphorin3F (SEMA3F) est induite par p53 endogène et exogène. La surexpression de SEMA3F inhibe la croissance dans le cancer du poumon (Futamura et al., 2007).

#### Les homologues de p53 :

20 ans après la découverte de p53, ses premiers homologues p73 et p63 ont été trouvés. P73 et p63 sont capables de se fixer sur les séquences spécifiques pour la p53 et d'induire la transcription des gènes cibles de p53 comme p21, MDM2, Bax and GADD45 (Arrowsmith, 1999). Il y a des études montrant que p73 et p63 sont impliquées dans la tumorigénèse et la réponse aux chimiothérapies et à la radiothérapie. Pourtant, les souris homozygotes p63-/- (Yang et al., 1999) and p73-/- (Yang et al., 2000) manifestent diverses anomalies de développement, mais elles ne développent pas de tumeurs. La délétion hétérozygote de p63 et de p73 rend les souris plus sensibles au développement de diverses tumeurs (Flores et al., 2005). L'expression de p63 et de p73 est plus élevée dans les tumeurs avec p53 mutée (Zaika et al., 1999)(Soussi and Béroud, 2001). Les changements de

conformation de p53 mutée sont réversibles dans une certaine mesure. Une ou plusieurs mutations supplémentaires sur p53 mutée peuvent parfois restaurer sa fonction de type sauvage. La suppression de la séquence de régulation négative en C-terminal améliore non seulement la fonction de p53wt, mais restaure également une certaine activité chez p53 mutée. L'activation ou la libération de p73 ou de p63 par des cellules mutées pour p53 semble être une voie alternative de reconstitution de p53 ou d'activité p53-like dans les cellules tumorales (Selivanova et al., 1998).

### 3. IMMUNOSURVEILLANCE ET EVASION TUMORALE

Comme nous l'avons exposé ci-dessus, de multiples mécanismes permettent de prévenir l'apparition des cancers en induisant la sénescence ou l'apoptose. Toutefois, dans le cas où ce système échoue, les cellules cancéreuses peuvent être reconnues et éliminées par les cellules du système immunitaire. Le système immunitaire est capable d'éliminer un cancer ou de le maintenir dans un état dormant pendant de très longues périodes. Mais, si les cellules cancéreuses échappent à l'immunosurveillance, cela aboutit à la croissance d'un cancer cliniquement apparent (Dunn et al., 2006).

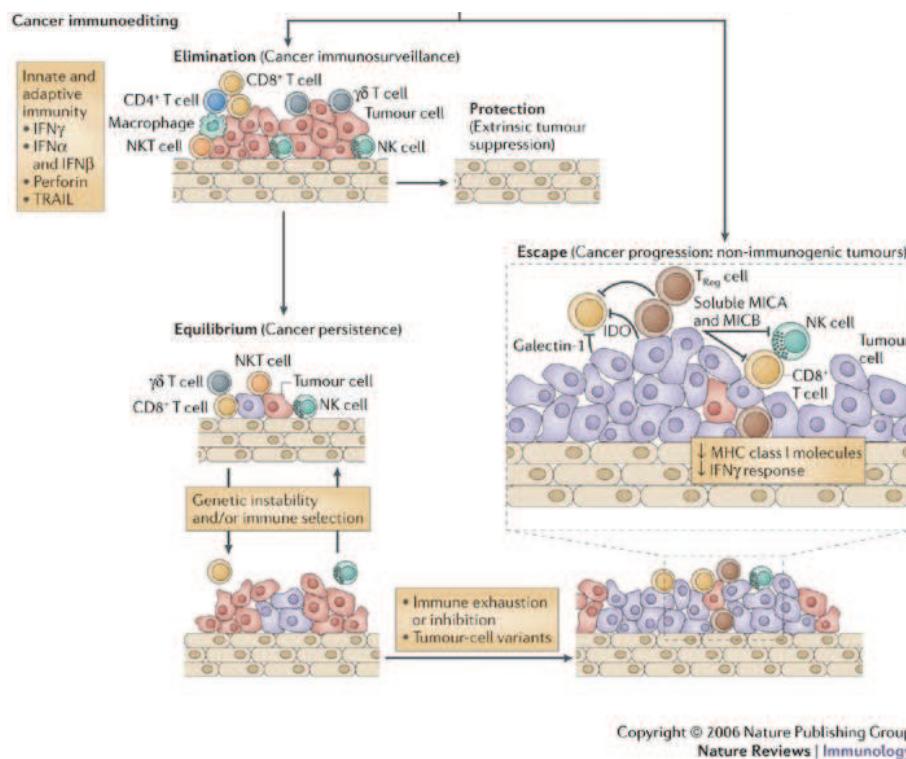


Figure 12 : Interactions entre le système immunitaire et le cancer.

Ces interactions peuvent avoir trois issues 1) élimination du cancer : reconnaissance et la destruction des cellules tumorales, 2) équilibre : maîtrise de l'expansion des cellules transformées, mais pas d'éradication, 3) échappement : les cellules tumorales possèdent la capacité d'atténuer les réponses immunes (Dunn et al., 2006).

### Echappement aux cellules immunitaires/PD-L1.

Les cellules du système immunitaire peuvent avoir la capacité de reconnaître, infiltrer et éliminer certaines cellules cancéreuses; pourtant, quelques unes de ces dernières échappent à la surveillance immunitaire et à la mort induite par le système immunitaire. L'immunosurveillance implique les cellules du système immunitaire inné comme les lymphocytes NK et les cellules du système immunitaire adaptatif comme les CTL (Cytotoxic T Lymphocytes), les LTh (Lymphocytes T helper).

Les tumeurs peuvent induire une tolérance ou résister à la destruction par les cellules immunitaires effectrices via de multiples mécanismes : un certain nombre de tumeurs répriment la modulation du système immunitaire adaptatif, par exemple, via la réduction de l'expression du CMH-I (Drake et al., 2006) et du système immunitaire inné par exemple, via la régulation négative de l'expression des ligands reconnus par les cellules NK tels que MICA (ligand du récepteur NKG2D-Natural Killer Group 2D) (Lee et al., 2004). Certaines cellules tumorales pour éviter l'apoptose induite par Fas, diminuent son expression à leur surface. De plus, les cellules tumorales peuvent sécréter le ligand de Fas, qui se lie à son récepteur sur les CTL et les NK et initie l'apoptose dans les cellules du système immunitaire (Nagata, 1996)(Schimmer, 2004). Les cellules tumorales favorisent également un état anti-inflammatoire qui aide à la croissance de la tumeur. Par exemple, les cellules tumorales peuvent sécréter de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , qui ont des effets immunosuppresseurs sur les LT effecteurs et les macrophages (Rabinovich et al., 2007) (Zamarron and Chen, 2011). Les cytokines sécrétées par les cellules tumorales peuvent également stimuler le recrutement des macrophages, qui ont une activité anti-tumorale (M1) ou pro-tumorale (M2). Au début du développement de la tumeur, les macrophages exposés à de l'IFN- $\gamma$  ont une activité anti-tumorale (M1), mais les macrophages activés en réponse à des produits de cellules tumorales (comme l'IL-10) peuvent favoriser la croissance des tumeurs (M2). Certains produits de macrophages comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 peuvent également favoriser la progression des cancers (Mantovani and Sica, 2010). Le VEGF-A (Vascular endothelial growth factor-A) sécrété par les cellules tumorales en réponse à l'hypoxie joue aussi un rôle crucial dans l'immuno-évasion. Il induit les Treg (lymphocytes T régulateurs) et inhibe la maturation des DC (dendritic cells). Les DC immatures secrètent du TGF- $\beta$ , qui peut aussi à son tour

favoriser la conversion de LT conventionnelle en Treg (Ghiringhelli et al., 2005b), (Belkaid and Oldenhove, 2008).

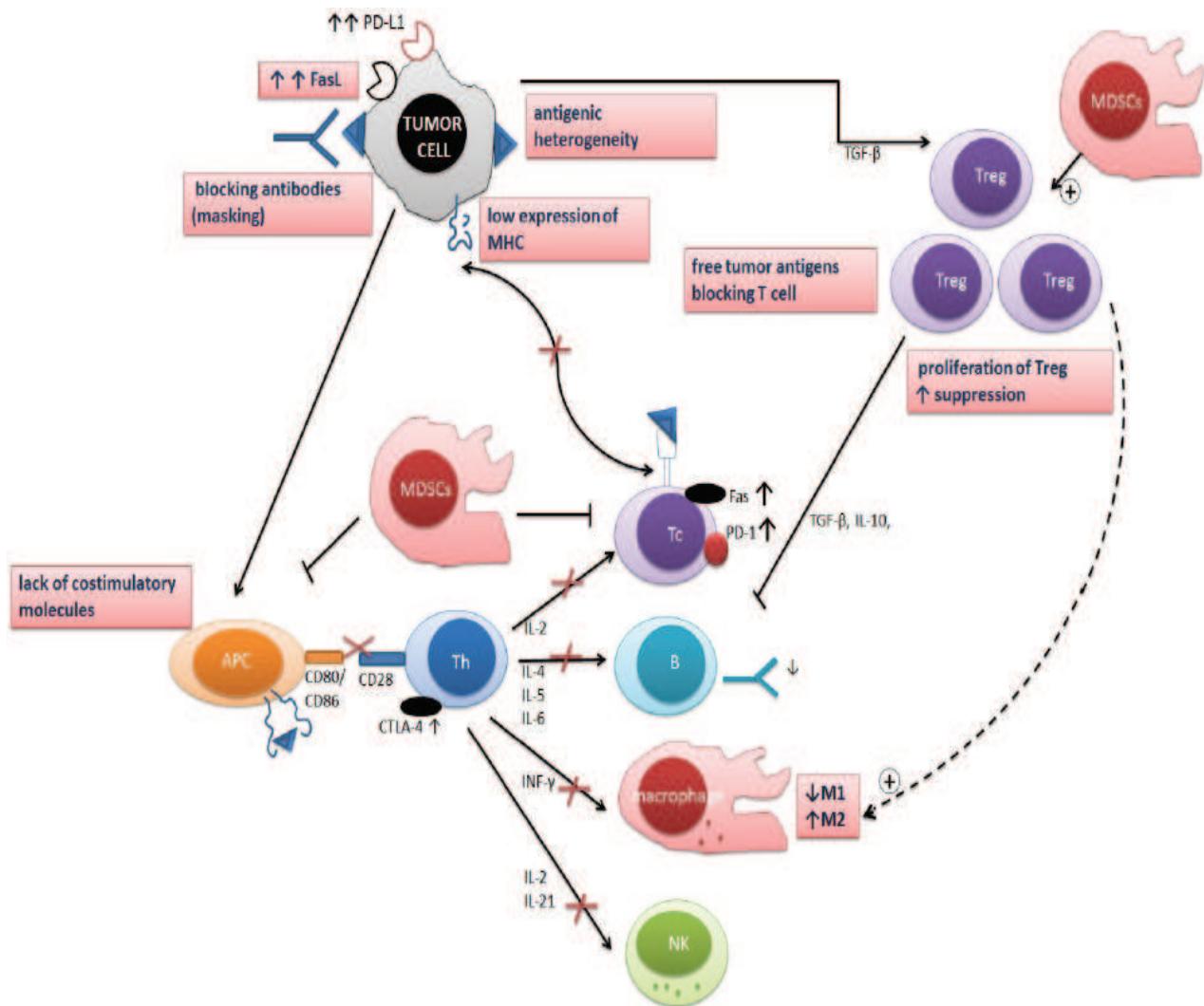


Figure 13 : Les mécanismes majeurs de l'évasion tumorale.

Pour ne pas être reconnus par les cellules du système immunitaire, les cellules cancéreuses utilisent divers moyens comme :

- la libération de cytokines inhibitrices (comme le VEGF, l'IL-10 et le TGF- $\beta$ ),
- l'expression de molécules inhibitrices (comme PD-L1, Galectine 9),
- la perte des ligands solubles pour les récepteurs activateurs des cellules NK comme ULBPs (UL16 binding proteins), MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A), MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B), FasL (Fas ligand),
- la diminution du CMH (CMH-I) ou des molécules de co-stimulation (comme CD80),
- l'échappement à l'apoptose par la régulation négative de l'expression des récepteurs de mort etc. (Domagala-Kulawik et al., 2014).

La grande partie des défenses immunes contre les cellules tumorales se réalise dans les ganglions, où les LT rencontrent les antigènes tumoraux. Si cette rencontre aboutit à l'activation des LT, ceux-ci vont aller au site tumoral où ils peuvent reconnaître et éliminer

les cellules tumorales. Pour l'activation des LT deux signaux sont nécessaires. Le premier c'est la reconnaissance entre le TCR (T cell receptor) et le CMH-I, et le second est transmis par B7-1 ou B7-2 de l'APC (Antigen Presenting Cell) au CD28 des LT pour induire son activation. Les DC stimulées en périphérie par des signaux de danger expriment secondairement des molécules co-stimulatrices B7-1 et B7-2, qui servent pour l'activation des lymphocytes T (Dranoff, 2004) (Zielinski et al., 2013).

Un autre mécanisme de régulation négative des réponses immunes peut être l'induction sur les APC ou sur les cellules épithéliales de molécules inhibitrices (checkpoints inhibiteurs du système immunitaire) qui vont neutraliser les voies de signalisation de co-stimulation du système immunitaire.

Les récepteurs qui régulent négativement la fonction des LT CD4<sup>+</sup> ou des LT CD8<sup>+</sup> sont les suivants : CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), PD-1 (programmed death 1), LAG3 (lymphocyte activation gene 3 protein, connu comme CD223), 2B4 (connu comme CD244), KLRG1 (killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1), CD160, BTLA (B and T lymphocyte attenuator, connu comme CD272) et TIM3 (T cell membrane protein 3, connu comme HAVcr2), ICOS (inducible T cell co-stimulator), VISTA (V-domain Ig suppressor of T cell activation), KIR (killer cell immunoglobulin- like receptor), A2aR (adenosine A2a receptor). Leurs ligands comprennent CD80, CD86, PD-L1 (programmed cell death protein 1 ligand 1), PD-L2, CMH-II, CD48, E-cadhéchine, HVEM (herpesvirus entry mediator), GAL9 (galectine 9), PtdSer (phosphatidylserine), B7RP1 (B7-related protein 1), HMGB1 (high-mobility group box 1 protein) et sont exprimés par les APC ou les cellules tumorales (Pardoll, 2012)(Nguyen and Ohashi, 2015) etc.

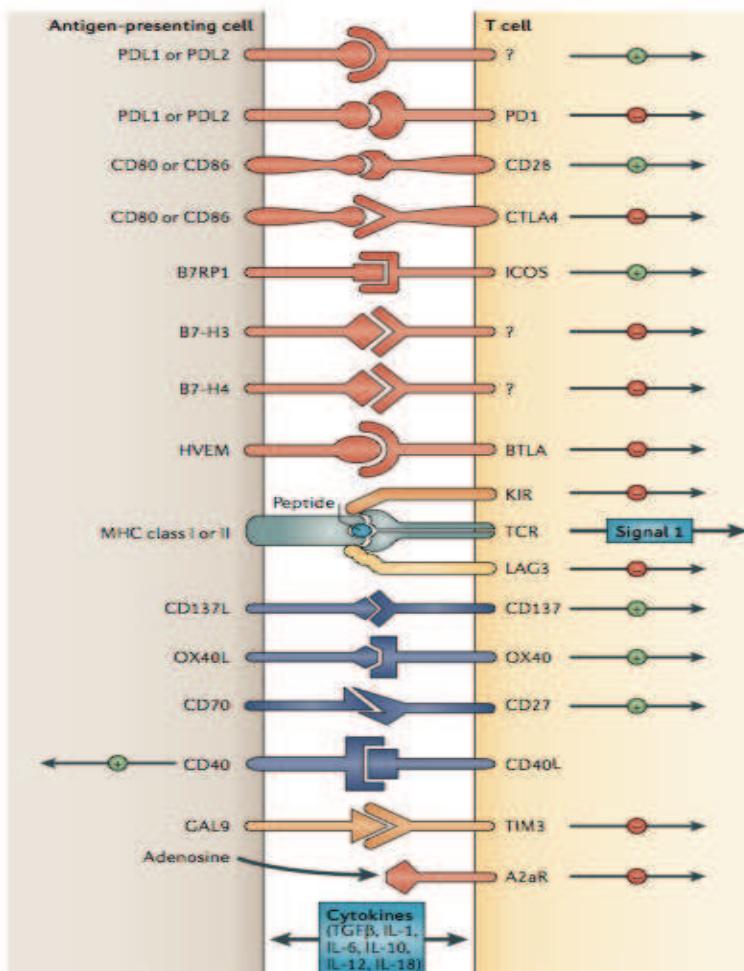


Figure 14 : Les interactions co-inhibitrices et co-stimulatrices de la synapse immunologique.

Diverses interactions ligand-récepteur entre les LT et les CPA régulent la réponse des LT à un antigène (CMH- TCR). Les cellules T ne répondent pas à ces interactions ligand-récepteur sauf si elles reconnaissent d'abord leur antigène correspondant par le TCR. Un grand nombre de ligands se lient à des récepteurs multiples, dont certains délivrent des signaux co-stimulateurs et d'autres fournissent des signaux inhibiteurs. La famille B7, est une famille importante de ligands qui se lient avec les récepteurs co-stimulateurs et co-inhibiteurs. Les membres de la famille du TNF qui se lient aux récepteurs du TNF représentent une deuxième paire de la famille de régulation ligand-récepteur. Les cytokines solubles dans le microenvironnement représentent une autre grande catégorie de signaux qui régulent l'activation de LT.

PD-1 peut se lier à PD-L1 (B7-H1) et PD-L2 (B7- DC), ce qui entraîne dans la plupart des cas l'inhibition de l'activation des LT (Rabinovich et al., 2007). La combinaison des traitements bloquant PD-1 et CTLA-4 augmente significativement l'immunité anti-tumorale par rapport au blocage d'une seule voie de signalisation (Curran et al., 2010). Ainsi, les travaux précliniques montrent les effets synergiques de la combinaison du traitement anti-PD-1 avec les blocages des autres molécules de point de contrôle immunologique comme LAG-3(Woo et al., 2012) et TIM-3 (Sakuishi et al., 2010). LAG3 (CD223) est connu pour améliorer la fonction des Treg, et ainsi inhiber les fonctions des LT effecteur CD8 $^+$ . Le seul ligand connu de LAG3 est le CMH de classe II ; il est induit dans certaines cellules épithéliales (en générale en réponse à l'IFN- $\gamma$ ), et est aussi exprimé par les DC et les TIM(tumour-infiltrating macrophages) (Huang et al., 2004)(Grosso et al., 2007). Quant à LAG-3, il est exprimé sur les LT activés, les NK, les LB, les pDC et cela joue un grand rôle dans la régulation négative de la prolifération des LT via sa fixation d'haute affinité avec le CMH de classe II.

(Shin and Ribas, 2015). TIM3 a été découvert comme une molécule exprimée sur les LT secrétant de l'IFN- $\gamma$ , comme les Th1 (CD4 $^+$  T helper 1) et les TC1 ( CD8 $^+$  T cytotoxic 1) (Monney et al., 2002). TIM3 est connu pour inhiber la réponse Th1 et les Ac anti-TIM3 favorisent l'immunité anti-tumorale. Le ligand de TIM3 est Galectin-9, il est exprimé principalement sur les Treg, les MDSC et divers types de cancers (Zhu et al., 2005), (Anderson, 2014). Dans les modèles animaux, le blocage de PD-1 et de TIM3 améliore les réponses immunitaires anti-tumorales et le rejet de la tumeur (Sakuishi et al., 2010).

Les autres membres de la superfamille des immunoglobulines B7 sont B7-H3, B7-H4 et B7-H5. B7-H3 (B7 homologue 3, CD276) a 31% d'homologie de séquence avec B7-H1. Il est fortement exprimé dans le cancer du sein, du pancréas, de la prostate, de l'ovaire et du rein. La fonction de B7-H3 est controversée, car il a des propriétés de co-stimulateur et de co-inhibiteur et son expression dans le cancer est associée soit à une survie prolongée, soit à un mauvais pronostic. B7-H4 (B7 homologue 4) est aussi un inhibiteur de l'activation des LT qui se lie à des récepteurs inconnus sur les LT. Au niveau protéique, il est exprimé par les APC, ainsi que par les cellules tumorales. Une expression élevée de B7-H4 est de mauvais pronostic dans le cancer ovarien, le cancer du sein, du pancréas, de la prostate, du rein, le cancer gastrique et le gliome. B7-H5, connu comme VISTA ou un homologue de PD-1, est aussi un régulateur négatif de points de contrôles immunologiques qui partagent des homologies avec PD-L1. VISTA induit FOXP3 dans les LT. Dans les modèles murins, son expression est positivement corrélée avec CD11b; dans les cellules tumorales, il favorise l'invasion via l'induction de MMP (matrix métalloprotéinase type I). Ainsi le blocage de VISTA améliore l'immunité anti-tumorale (Shin and Ribas, 2015).

#### PD-L1 (B7-H1)

PD-L1 (Programmed death-ligand 1) ou CD274, également connu comme B7-H1, est une molécule inhibitrice des LT, qui est impliquée dans la protection des cellules tumorales contre une attaque immunitaire (Iwai et al., 2002). Il s'agit d'une glycoprotéine de surface connue pour être exprimée sur des cellules classiques CD4 $^+$  et CD8 $^+$ , les cellules dendritiques (DC), les macrophages, les cellules B, les Treg, les cellules épithéliales, les cellules

endothéliales, les sites privilégiés immunitairement telles que la barrière foeto-maternelle (Kuipers et al., 2006) (Ghebeh et al., 2006) et sur une majorité de cellules tumorales (voir tableau 2).

**Tableau 2 : Expression de PD-L1 dans divers cancers.**

Type de cancer	% PD-L1+	Références
Mélanome	40–100	(Wang et al., 2011b)
		(Hino et al., 2010)
		(Dong et al., 2002)
NCLSC	35–95	(Wang et al., 2011b)
		(Dong et al., 2002)
		(Konishi et al., 2004)
Cancer du nasopharynx	68–100	(Yang et al., 2011)
		(Hsu et al., 2010)
Glioblastome/ gliome mixte	100	(Wintterle et al., 2003)
Adénocarcinome du colon	53	(Dong et al., 2002)
Carcinome hépatocellulaire	45–93	(Wang et al., 2011a)
		(Gao et al., 2009)
		(Zeng et al., 2011)
Cancer urothelial	28–100	(Nakanishi et al., 2007)
		:(Inman et al., 2007)
Le myélome multiple	93	(Liu et al., 2007a)
Cancer ovarien	33–80	(Dong et al., 2002)
		(Hamanishi et al., 2007)
		(Brown et al., 2003)
Carcinome Gastroïntestinal	42	(Wu et al., 2006)
Cancer de l'œsophage	42	(Ohigashi et al., 2005)
Le cancer du pancréas	39	(Nomi et al., 2007)
RCC	15–24	(Wang et al., 2011b)
		(Krambeck et al., 2007)
		(Thompson et al., 2006)
Le cancer du sein	31–34	(Dijkers et al., 2009)
		(Ghebeh et al., 2006)
Lymphomes	<u>17–94a</u>	(Xerri et al., 2008)
		(Wilcox et al., 2009)

Leucémies	11–42	(Tamura et al., 2005)
		(Berthon et al., 2010)
		(Kozako et al., 2009)
		(Chen et al., 2008)

Les cellules cancéreuses relarguent des cytokines immunsuppressives telles que le TGF- $\beta$ , l'IFN- $\gamma$  et Fas ligand, qui induisent l'expression de PD-L1 et ainsi aide les cellules tumorales à échapper aux réponses immunitaires (Liu et al., 2007a). L'expression de PD-L1 a été associée aux facteurs clinico-pathologiques dans divers cancers : cancer du sein, de l'ovaire, du poumon, du nasopharynx, de l'œsophage, du foie, du pancréas, cancer gastrique, cancer colorectal, cancer rénal, mélanome, leucémie, col de l'utérus, gliome, etc. (cf., tableau 2), (Zou and Chen, 2008), (Afreen and Dermime, 2014). La régulation positive de PD-L1 peut permettre aux cancers d'échapper au système immunitaire de l'hôte, via la formation du complexe PD-1 /PD-L1 transmetteur d'un signal d'inhibition qui réduit la prolifération des LT CD8 $^{+}$ .

PD-L1 est une protéine transmembranaire qui joue aussi un rôle majeur dans la suppression du système immunitaire lors d'une grossesse, d'allogreffes de tissus, de maladie auto-immune etc.

PD-1 est exprimé sur les cellules myéloïdes, les LTregs, les LB, les LT CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$  activées par l'antigène, les NK et une haute expression de PD-1 est souvent présente sur les TILs (Raimondi et al., 2006). Des cellules du sang périphérique comme les CD4 $^{+}$  et CD8 $^{+}$  chez les patients atteints d'un cancer peuvent également exprimer PD-1, ce qui rend peu probable que les LT PD-1 $^{+}$  représentent exclusivement des LT spécifiques de la tumeur (Ahmadzadeh et al. 2009). La signalisation PD-1 dans les cellules NK régule négativement leur fonction et le blocage de PD-1 augmente la production d'IFN- $\gamma$  par les NK (Nguyen and Ohashi, 2015)

## Mécanismes d'induction et régulation dynamique de PD-L1.

Les types de cellules immunitaires telles que les LT, les LB, les cellules dendritiques, les macrophages et les monocytes expriment constitutivement PD-L1(Keir et al., 2008). PD-L1 exprimé dans divers types de cellules immunitaires peut aussi affecter l'immunité anti-tumorale. Par exemple, l'expression de PD-L1 par les cellules non-tumorales comme les MDSC (myeloid-derived suppressor cells) et les Treg est également susceptible d'être un médiateur important du dysfonctionnement des LT. PD-L1 exprimé sur les MDSC induit la production d'IL-10 par ces cellules, ce qui supprime la prolifération des LT CD8<sup>+</sup>, ainsi que la production d'IFN-γ et de médiateurs cytotoxiques tels que le Granzyme B (Huang et al., 2014). PD-L1 exprimé par des APC a un rôle dans l'induction de Treg périphérique (pTreg) et dans le maintien de la fonction suppressive des cellules pTreg (Francisco et al., 2009). La signalisation par PD-L1 dans les DC se traduit par une inhibition de la maturation des DC.

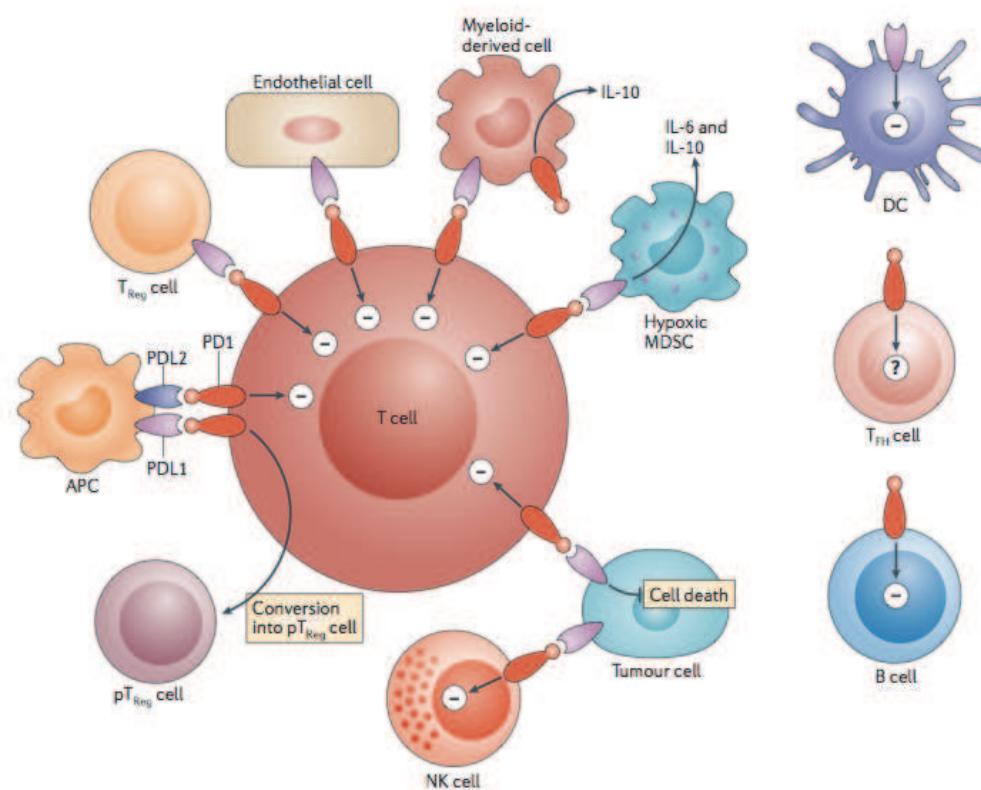


Figure 15 : Mécanismes d'action de PD-1, PD-L1 et de PD-L2.

PD-1, PD-L1 et PD-L2 exprimés dans divers types de cellules peuvent affecter l'immunité anti-tumorale comme illustré dans l'image ci-dessus. Le signe négatif indique que les interactions régulent négativement la fonction des cellules et le point d'interrogation indique un effet inconnu (Nguyen and Ohashi, 2015).

En revanche, PD-L1 peut être aussi induit en réponse à divers stimuli. L'expression de PD-L1 est souvent induite par les interférons, principalement par l'IFN-γ, auquel peut être attribué la résistance immunitaire adaptative des cellules tumorales. Il y a des études montrant une corrélation significative entre l'expression de PD-L1 et l'IFN-γ dans le microenvironnement tumoral. En effet, l'IFN-γ joue un rôle immunosuppresseur par l'induction de IRF-1 (Interferon Regulatory Factor), qui à son tour se fixe sur le promoteur de PD-L1 et induit son expression. D'autres cytokines, y compris IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 et IFN de type I ont également été démontrées pour induire l'expression de PD-L1 sur divers types de cellules (Brown et al., 2003) (Kinter et al., 2008) (Kryczek et al., 2008). Le TNF-α est aussi capable d'induire une expression de PD-L1. L'induction de PD-L1 par le TNF-α implique la voie de NF-κB, qui se fixe directement sur le promoteur de PD-L1 et induit son expression. Il y a aussi d'autres voies de signalisation impliquées dans l'induction de PD-L1. Par exemple, dans le cancer du poumon PD-L1 est induit par STAT3 (Marzec et al., 2008) . Dans le cancer du sein, une perte enchaînée de PTEN (phosphatase and tensin homolog), de PI3K/AKT (Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B) et de mTOR (mammalian target of rapamycin) conduit à l'induction de PD-L1 (figure 15), (Parsa et al., 2007), (Pardoll, 2012), (Afreen and Dermime, 2014). L'expression de PD-L1 est corrélée avec l'activation de la voie PI3K dans le cancer de la prostate (Crane et al., 2009). Il y a aussi des études montrant que PD-L1 favorise l'induction et les fonctions suppressives des Treg via la diminution de mTOR et la phosphorylation d'AKT (Francisco et al., 2009), (Ni et al., 2011). Ainsi, il a été montré que les voies ERK/p38-MAPK (Extracellular Signal-Related Kinase/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase) et PI3K sont impliquées dans l'induction de PD-L1 dans les MoDCs (monocyte-derived Dendritic Cells) et cDCs (conventional Dendritic Cells) du sang (Karakhanova et al., 2010).

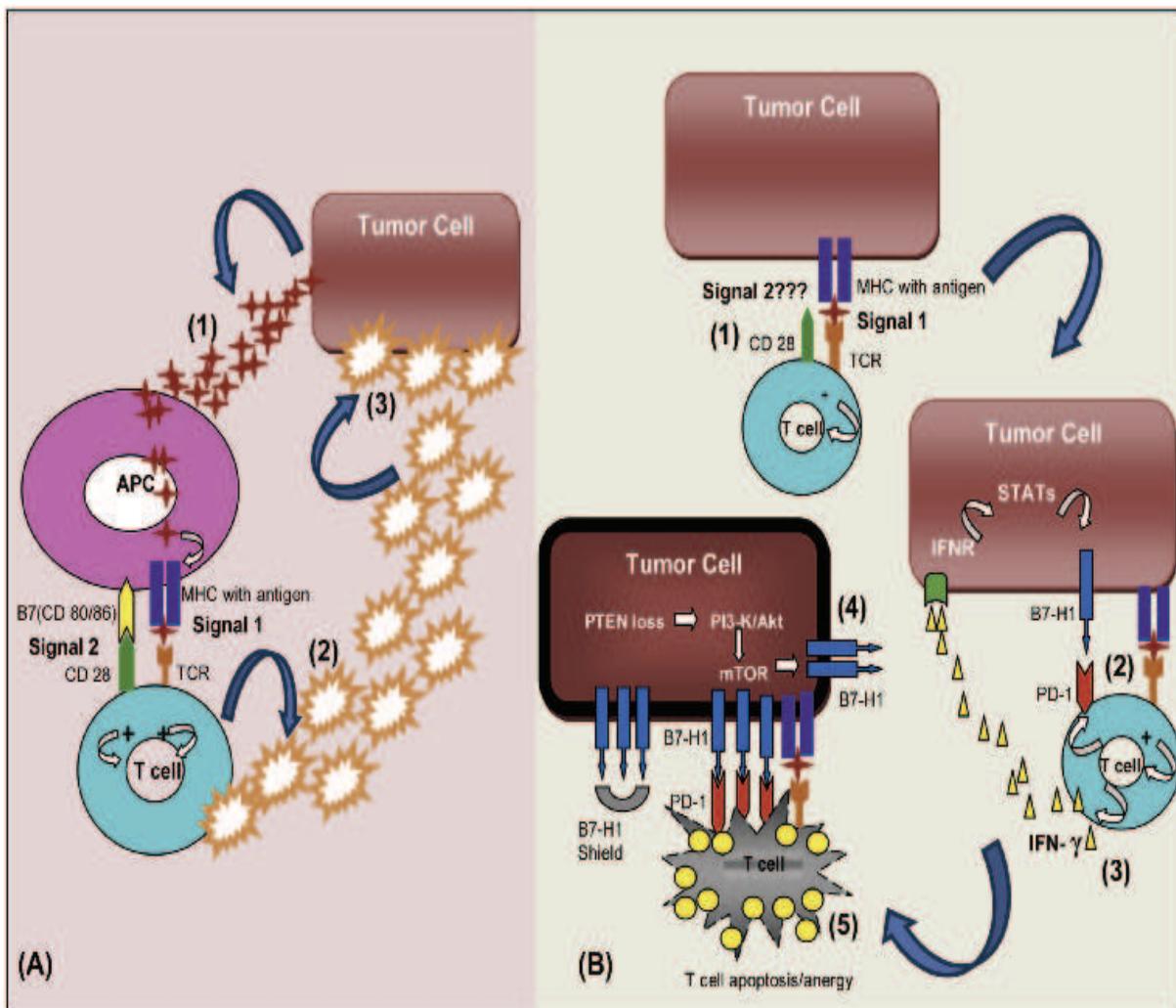


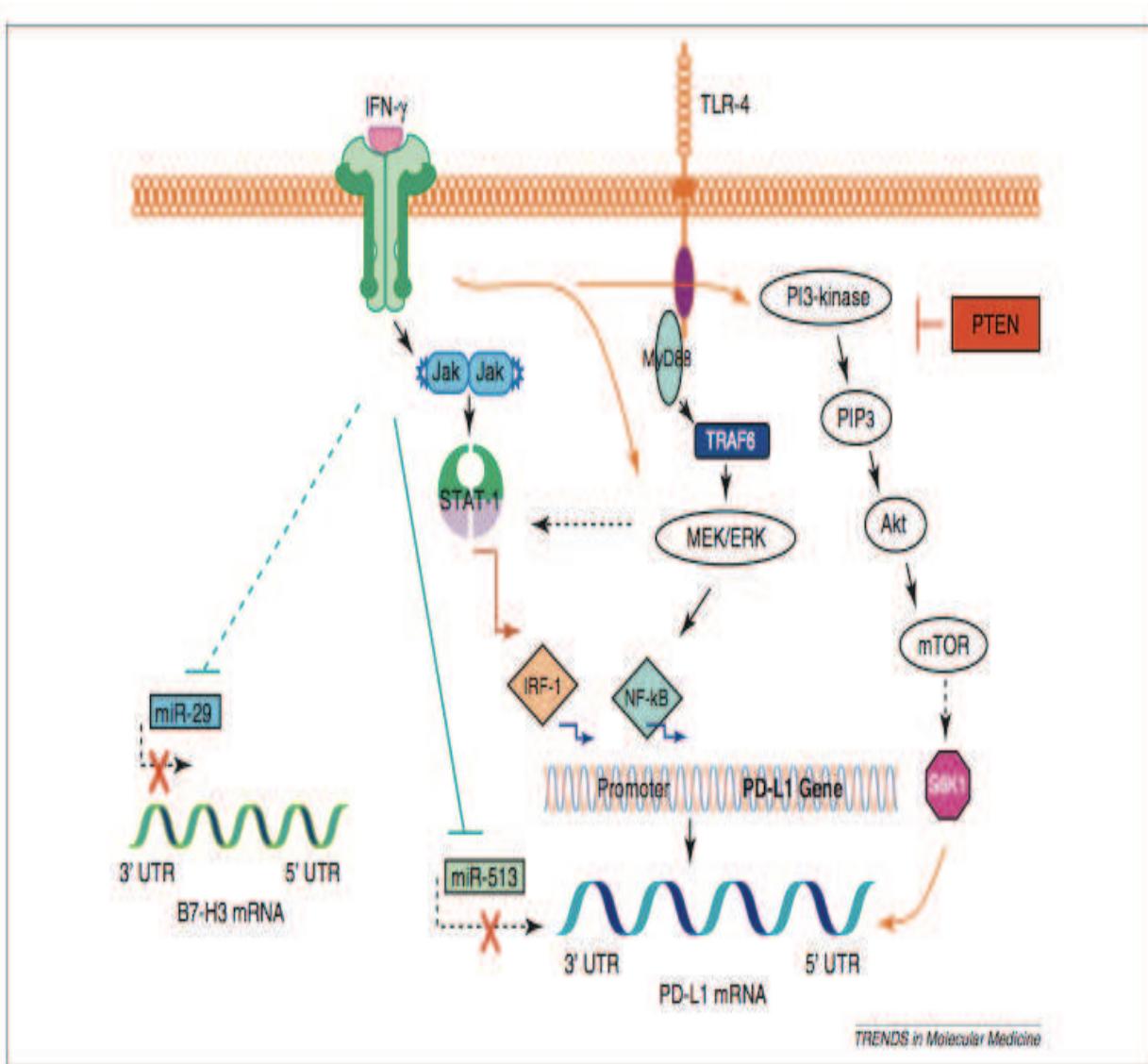
Figure 16 : Comparaison de la réponse immunitaire classique dirigée contre les antigènes tumorales par rapport à l'évasion immunitaire des cellules tumorales médiées par PD-L1.

(A) Réponse immunitaire classique dirigée contre les antigènes d'origine tumorale et la lyse des cellules tumorales. (1) Les antigènes tumoraux libérés par les cellules tumorales sont capturés par les APC et transformés en petits peptides pour la présentation par le CMH. La cellule T est activée par liaison du TCR avec le complexe CMH-Ag (signal 1). Un signal de co-stimulation (Signal 2: interaction B7/CD28) est également nécessaire pour une réponse immunitaire anti-tumorale efficace initiée par les LT. (2) Cela provoque la libération des composés cytotoxiques (tels que les granzymes/perforines) par les LT qui attaquent (3) et perturbent la membrane plasmique des cellules tumorales, ce qui provoque la mort/lyse des cellules tumorales.

(B) La défaillance des LT pour induire une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. (1) L'absence de signal 2 conduit à la présentation prolongée de l'Ag. (2) La présentation cohérente de l'antigène provoque l'induction de PD-1 sur les LT, suivie par (3) la libération de cytokines inflammatoires, l'activation des voies Stats et l'induction subséquentielle de PD-L1 sur les cellules tumorales. (4) La perte de la PTEN active les voies PI3-K/Akt et mTOR qui conduisent également à la régulation positive de PD-L1 sur les cellules tumorales. (5) La surexpression de PD-L1 et de PD-1 ainsi que leur interaction cause l'épuisement/l'anergie/l'apoptose des cellules T, ce qui permet aux cellules tumorales d'échapper efficacement au système immunitaire (Afreen et Dermime, 2014).

PD-L1 est surexprimé dans les cellules tumorales via l'activation des voies clés de l'oncogenèse comme PI3K, NF- $\kappa$ B, MAPK ou plus fortement par l'IFN- $\gamma$  produit dans le

microenvironnement tumoral par une réponse-T anti tumorale active (Chen et al., 2012a). Il semble que les différents types de cellules utilisent des voies encore divergentes se chevauchant pour réguler l'expression de PD-L1. Le promoteur PD-L1 a des sites de liaison pour IRF-1 et NF-κB. L' IFN-γ par la voie JAK / STAT-1 / IRF-1 et le TLR par la voie MEK / ERK / NF-κB peuvent induire l'expression de PD-L1. La signalisation par la voie PI3K/ Akt/ mTOR généralement inhibée par PTEN, peut activer S6K1 (S6 kinase 1), qui régule la 50-UTR du PD-L1 et augmente sa translation (Barach et al., 2011) (figure 16).



**Figure 17 : Régulation de PD-L1.**

Le promoteur de PD-L1 a des sites de liaison pour les facteurs de transcription IRF-1 et NF-κB. L' IFN-γ par la voie de signalisation JAK / STAT-1 / IRF-1 augmente la transcription du gène PD-L1. La signalisation via le ligand de TLR, par la voie de signalisation MEK / ERK / NF-κB augmente la transcription du gène de PD-L1. La signalisation par la voie PI3K /Akt/ mTOR, généralement inhibée par PTEN, peut activer S6K1, qui régule la 50-UTR de PD-L1. Cela aboutit au recrutement des transcrits de PD-L1 à polysomes et à la translation de PD-L1. - miR-513 empêche la translation de PD-L1 en se liant à la PD-L1 30-UTR et ce miR peut être inhibé par la signalisation de l' IFN-γ (Yael S. Barach and al. 2011).

Ciblage des inhibiteurs des points de contrôles immunologiques dans la thérapie des cancers.

L'augmentation de l'expression de PD-L1 a été démontrée dans de nombreux types de cancers (par exemple, le mélanome (40% -100%) le NSCLC (non-small-cell lung carcinoma) (35% -95%), et le MM (myélome multiple) (93%)). De plus, des niveaux élevés de PD-L1 sont liés à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, le cancer rénal, le cancer ovarien etc. (Romero et al., 1998), (Muenst et al., 2014), (Thompson et al., 2004), (Hamanishi et al., 2007). Il a été aussi montré que l'expression de PD-L1 peut augmenter la résistance des cellules tumorales aux traitements (Noh et al., 2015). Les cellules de la moelle osseuse adhèrent à la surface des cellules tumorales à travers l'interaction avec un récepteur CD11b. Cette interaction active la voie de signalisation p38 et induit l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales (Noh et al., 2015).

Les Ac anti-PD-1 Nivolumab ou Pembrolizumab (MK-3475) bloquent la fixation de PD-1 avec ses deux ligands PD-L1 (B7-H1, CD274) et PD-L2 (B7-DC, CD273). Le Nivolumab (Opdivo; Bristol-Myers Squibb / Ono Pharmaceuticals) montre des réponses objectives dans différents types de cancer (mélanome, cancer du rein et des poumons) et c'est le premier anticorps anti-PD-1 à obtenir une autorisation de mise sur le marché au Japon dans le mélanome avancé non résectable et les essais cliniques de Phase III de Nivolumab sont toujours en cours. Pembrolizumab (Keytruda; Merck & Co.) est un autre agent anti-PD-1 approuvé aux États-Unis, pour le traitement du mélanome métastatique. Il y a aussi des anti-PD-L1 en phase clinique I montrant des réponses objectives comme BMS-936559 dans le mélanome (17%), dans le NSLCS (10%), dans le cancer de l'ovaire (6%) et du rein (12%) (Brahmer et al., 2012); et MPDL3280A dans le mélanome avancé (29%), le cancer du rein (13%) et le NCLCS (23%) (Desbois et al., 2015) etc.

Les effets cliniques et immunologiques du ciblage de PD-1 dans le cancer du poumon ont été étudiés. En effet, dans une étude clinique de Phase I incluant 38 patients atteints de NSCLC, le traitement avec Pembrolizumab (10mg/kg chaque 3 semaines) a donné 21% de ORR (objective response rate), l'OS (overall survival) fut de 51 semaines et la PFS (progression free survival) de 9,7 semaines. Dans une autre étude de Phase I incluant 129 patients atteints de NSCLC, le traitement avec Nivolumab (1-10mg/kg chaque 2 semaines,

maximum 12 cycles) a donné 17% de ORR, l'OS a été de 9,5 semaines et la viabilité au bout de 1 an présentait 42%.

Parmi les ligands de points de contrôles immunologiques, PD-L1 est le plus étudié dans le cancer de poumon, mais l'induction de PD-L2, B7-H3 et de B7-H4 a aussi été rapportée (Zou and Chen, 2008) (Pardoll, 2012). Contrairement au ciblage de PD-1, le ciblage de PD-L1 ne peut pas inhiber la réponse des LT dirigés vers les tumeurs qui expriment de manière constitutive des niveaux élevés de PD-L2 (Chen et al., 2012a). Par contre, l'expression forcée de PD-L1 sur les cellules tumorales de souris inhibe les réponses antitumorales locales mediées par les LT (Iwai et al., 2002)(Konishi et al., 2004)(Dong et al., 2002).

## **IV. LES VOIES IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DE PD-L1**

### ***NUCLEAR FACTOR-KAPPA B***

#### *Structure de NF-κB*

NF-κB est un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses voies de signalisation. Il est caractérisé comme un régulateur majeur des réponses aux pathogènes et aux virus (Li et al., 2012b). Des travaux plus récents montrent que NF-κB est activé dans plusieurs cancers humain et associé à l'oncogenèse via la régulation de l'expression de gènes liés au cycle cellulaire, à la survie, apoptose etc. La famille de NF-κB possède 5 membres: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52 (NF-κB2) et p105/p50 (NF-κB1) (Baldwin, 1996). Les protéines p100/p52 et p105/p50 constituent la Classe1, les autres membres de la famille NF-κB : p65, Rel-B et c-Rel constituent la Classe2. Les deux classes de protéines contiennent un domaine de liaison à l'ADN (DBD) qui sert à l'interaction de NF-κB avec les autres facteurs de transcription et à la liaison avec IκBs. La partie C-terminale des protéines de classe 1 contient une partie avec des domaines ankyrin répétés et possède une activité transrépressive. A l'inverse, les protéines de classe2 possèdent un domaine de transactivation (Zhong et al., 2002)

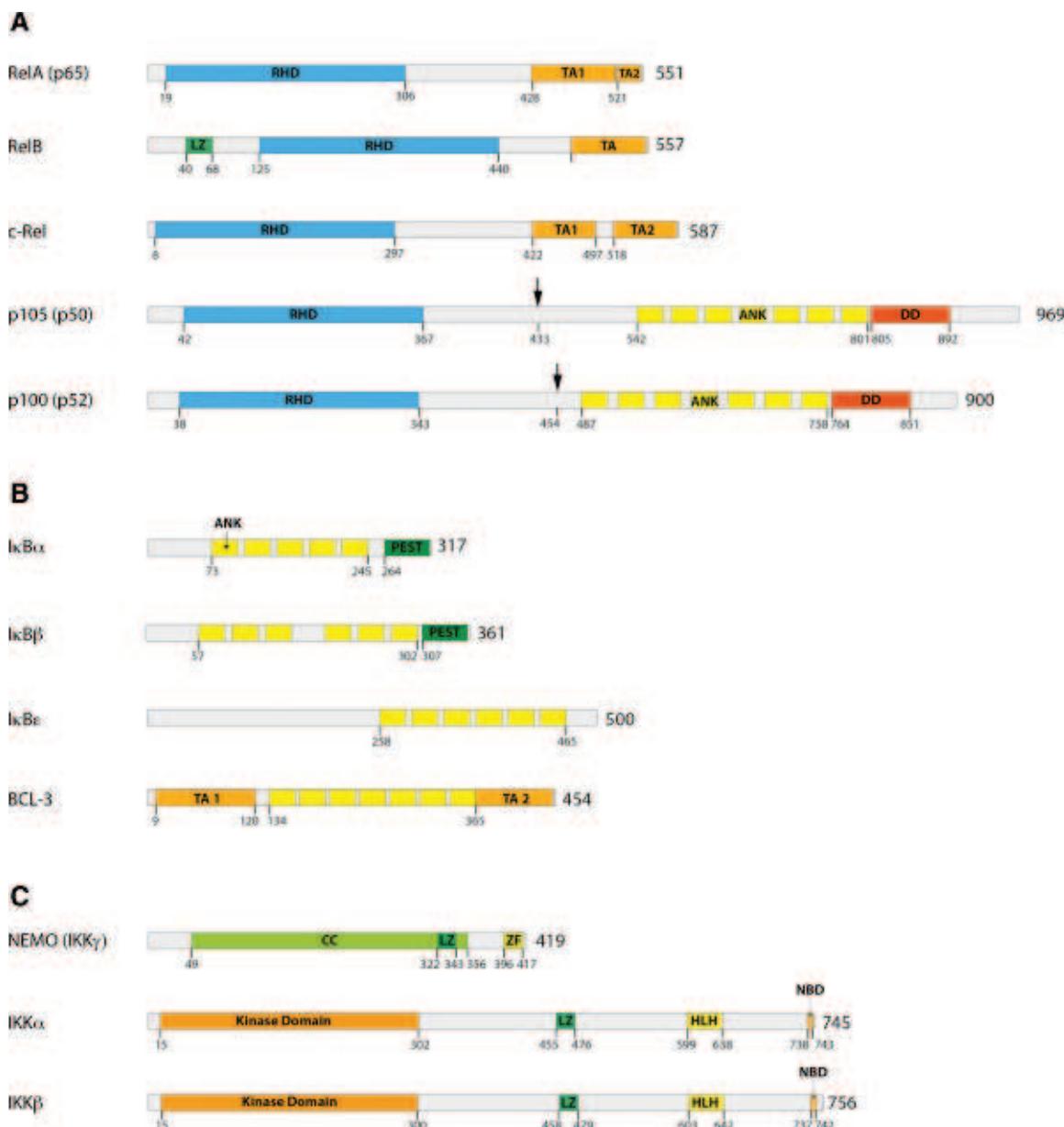


Figure 18 : Les différents domaines des unités de la voie NF-κB.

L'activation de NF-κB est assurée via la phosphorylation d'IκB par les kinases de la famille d'IKK. La famille d'IκB est composée de 4 membres de protéines inhibitrices de NF-κB : IκB $\alpha$ , IκB $\beta$ , IκB $\epsilon$  et BCL-3. Ces protéines sont caractérisées par la présence des zones répétées de type ankyrin qui interviennent dans la liaison d'IκB aux protéines de NF-κB. Dû à la présence de zone répétée d'ankyrin p100 et p105 peuvent être inclus dans la famille d'IκB. En plus, IκB $\alpha$  et IκB $\beta$  contiennent les domaines de PEST qui sont riches en proline, glutamate, sérine et thréonine et sont requis pour le changement constitutif. BCL-3 contient les domaines TA qui interviennent dans l'activité transcriptionnelle quand BCL-3 se lie à NF-κB (Hoesel and Schmid, 2013) RHD=Rel-homology domain ; TA1/2=Transactivation1/2 ; CC=coiled-coil domain ; LZ=leucin-ziper-like-motif ; DD=death domain ; ANK=ankryrin repetition domain ; HLH=helix loop helix ; NBD=nemo binding domain ; ZF=zinc finger domain ; PEST= proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T).

Les structures cristallographiques d'IκB(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor)- $\alpha$  et IκB- $\beta$  liées aux dimères p65/p50 ou p65/c-Rel révèlent que les protéines IκB ne masquent que le domaine NLS (nuclear localization

sequence) de p65. La présence de NLS libre de p50 qui est lié avec le domaine NES (nuclear export sequence) d'IkB $\alpha$ , assure la stabilité des complexes d'IkB/NF- $\kappa$ B entre le cytoplasme et le noyau. La balance dynamique entre la localisation cytoplasmique et le noyau est altérée lors de la dégradation d'IkB. Ceci engendre une augmentation de la quantité de p65 avec des domaines NLS libres et favorise la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (Hayden and Ghosh, 2004)

Régulation de NF- $\kappa$ B :

L'activation de NF- $\kappa$ B passe par la libération de molécules d'IkB ou par le clivage des zones répétées d'ankyrine de p100 et p105. Le clivage est réalisé par la dégradation protéasomique des inhibiteurs ou par la dégradation partielle des précurseurs. Avant l'étape de dégradation, IkB est ubiquitinylé par les membres de la famille d'ubiquitine-ligase de Skp1-Culin-Roc1/Rbx/Hrt-1-F-box (SCF ou SRCF). Ces enzymes reconnaissent leurs substrats par la présence de sites spécifiques de phosphorylation (Hayden and Ghosh, 2004) . L'activation de NF- $\kappa$ B peut être induite par différentes stimulations. Dans la voie canonique, l'activation de NF- $\kappa$ B peut être déclenchée par les molécules comme le LPS, le TNFR $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ . Ces ligands sont reconnus par TLRs, TNFR, IL-1R. La stimulation passant par ces récepteurs active le complexe IKK, qui phosphoryle principalement IkB $\alpha$  par IKK $\beta$  (Hoesel and Schmid, 2013). Mais en général, les IKK sont constituées de trois sous-unités : deux sous-unités de kinase – IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et une sous-unité régulatrice NEMO (NF- $\kappa$ B essential modifier) (Rothwarf and Karin, 1999).

La voie non-canonique ou alterne de NF- $\kappa$ B est activée via d'autres récepteurs membranaires incluant BAFFR (B-cell activating receptor), LTBR (lymphotoxin-B receptor), CD40R, RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B), TNFR (Tumor necrosis factor receptor) et Fn14. Ces molécules stimulent NF- $\kappa$ B via l'activation de NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) qui phosphoryle essentiellement IKK $\alpha$ . L'activité de cette dernière protéine induit la phosphorylation de p100 et résulte dans la formation de p52 via sa dégradation partielle par ubiquitylation.

La dernière voie d'activation de NF- $\kappa$ B est une voie atypique, où le complexe d'IKK est activé après un stress génotoxique via la kinase ATM(ataxia telangiectasia mutated)

conduisant l'ubiquitinylation de NEMO. Il y a différents types d'activation du complexe d'IKK impliquant des kinases comme la caséine kinase 2 ou les tyrosines kinases. (Hoesel and Schmid, 2013)

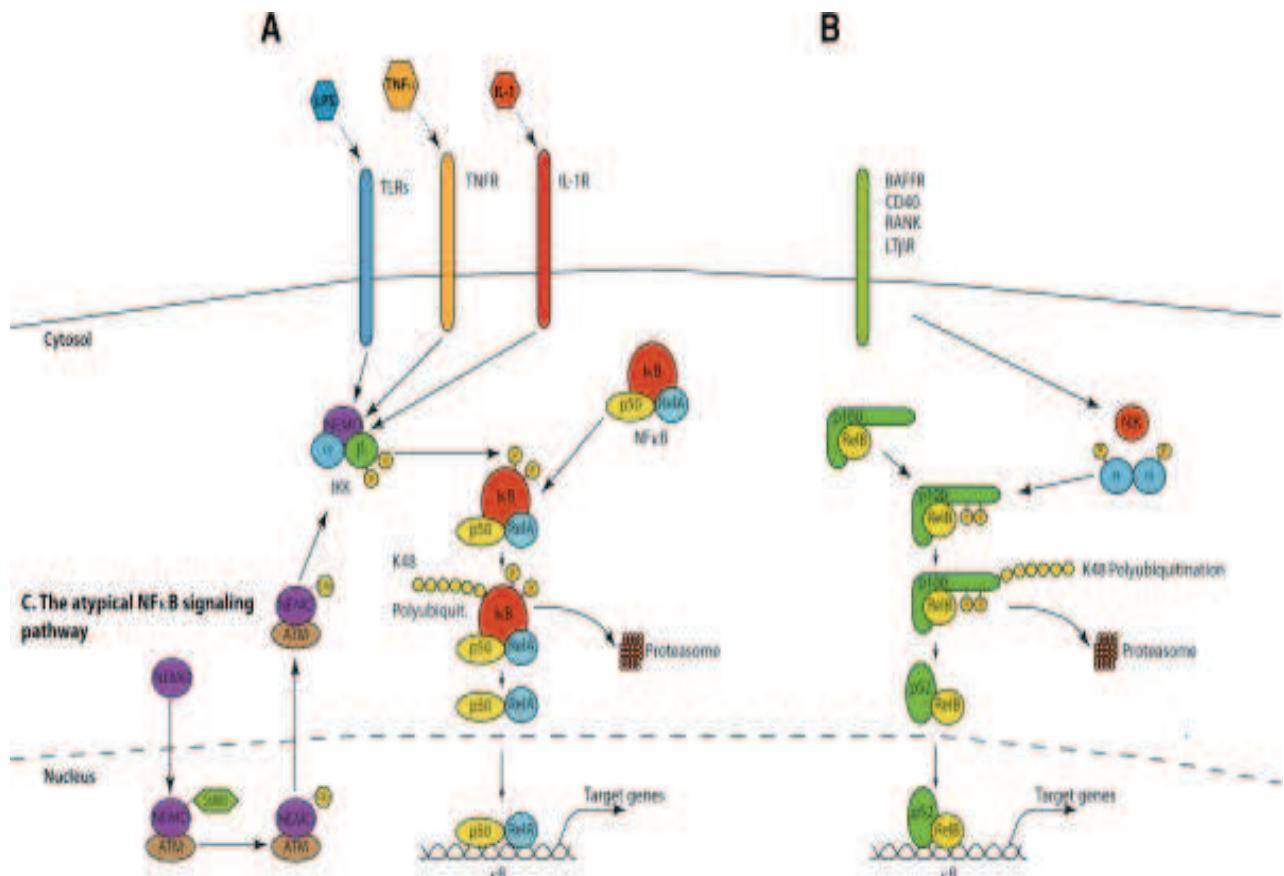


Figure 19 : Les voies de signalisation de NF-κB.

#### Les voies de signalisation de NF-κB : canonique, non-canonique, atypique.

(A) Dans la voie canonique d'activation de NF-κB, LPS (lipopolysaccharide), TNF- $\alpha$  ou IL-1 activent les TLRs (Toll-like receptors), TNFR et IL-1R respectivement. Suite à cette interaction ligand-recepteur IKK $\beta$  s'active et phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  dans les résidus de serine S32 et S36.

(B) Dans la voie non-canonique d'activation de NF-κB B-BAFFR, CD40, RANK ou LTbR aboutis à l'activation d'IKK $\alpha$  via le NIK. IKK $\alpha$  peut phosphoryler p100 dans les résidus séries S866 et S877. Cette phosphorylation mène à l'ubiquitinylation de p100 et à sa maturation via le protéasome. A ce moment là, les hétérodimères peuvent activer les gènes cibles.

(C) Dans la voie atypique de signalisation de NF-κB, le stress génotoxique conduit à la translocation de NEMO vers le noyau où il est sumoylé et ubiquitiné ultérieurement. Ce processus est médié via « ATM checkpoint kinase ». Ensuite NEMO et ATM reviennent dans le cytoplasme où ils activent IKK $\beta$  (Hoesel and Schmid, 2013).

L'activité transcriptionnelle de plusieurs gènes cibles est contrôlée via les facteurs de transcription qui peuvent diminuer ou augmenter l'effet de NF-κB en déterminant un liant avec les voies de signalisation qui activent les autres facteurs de transcription.

Les dernières études montrent le rôle de la modification post-traductionnelles de NF- $\kappa$ B, surtout pour la sous-unité RelA, dans la transcription des gènes cibles. Parmi ces modifications, la phosphorylation des résidus sérine et thréonine est le plus souvent observée. La phosphorylation de la sérine 276 (S 276) dans le domaine de RHD de RelA est réalisée par PKAc qui est activée via le LPS.

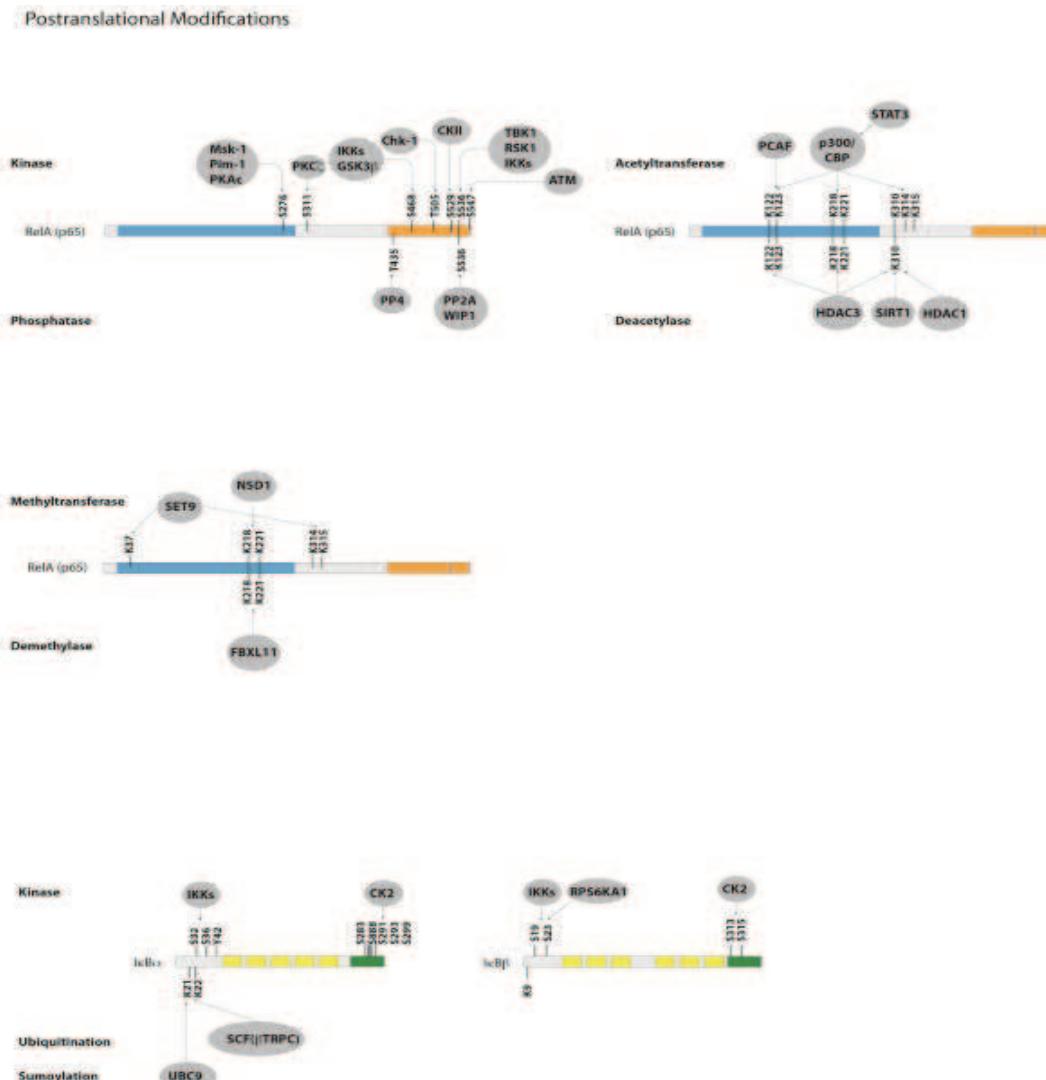


Figure 20 : Modifications post-traductionnelles de RelA, I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\beta$ .

Les kinases PKC $\epsilon$ , CKII et ATM phosphorylent les résidus sérine S311, S529 et S547 respectivement. En revanche, la kinase Chk-1 phosphoryle la thréonine 505 (T505). L'autre site de phosphorylation de RelA est le résidu sérine en position 536. S536 est phosphorylée par différentes kinases comme TBK1 (TANK binding kinase-1), RSK1 (ribosomal sub-unit kinase-1), et IKKs. La phosphorylation de S536 IKKs médierée est induite via TNF- $\alpha$ , LPS, H. pylori et le protein TAX codé par le HTLV-1 (human T lymphotrophic virus-1). La phosphorylation des résidus sérine de RelA n'est pas toujours associée à l'activation transcriptionnelle accrue de NF- $\kappa$ B, car, la phosphorylation de certains résidus comme S468, régule par ailleurs négativement l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B. S468 de RelA peut être phosphorylée via les différentes kinases GSK3 $\beta$  et IKKs. (Huang et al., 2010), (Hoesel and Schmid, 2013)

Les différentes stimulations, comme TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ , peuvent aussi activer PKAc et induire la phosphorylation de S276. Les kinases Msk-1(mitogen and stress activated protein kinase-1) et Pim-1 phosphorylent aussi la S276 et stimulent l'activité transcriptionnelle de RelA. MSK-1 phosphoryle S276 en réponse au TNF- $\alpha$ , à l'IL-1 $\beta$ , au RSV (Respiratory Syncytial Virus) et à l'infection par Helicobacter pylori. La phosphorylation de S276 via Msk-1 se fait dans le noyau et augmente l'activité de NF- $\kappa$ B en induisant l'expression de différentes cytokines, y compris l'IL-6 et l'IL-8.

La déphosphorylation de RelA sert au rétablissement de la réponse normale de NF- $\kappa$ B après la fin de la transcription des gènes cibles(Huang et al., 2010). Les phosphatases PP2A (Protein phosphatase 2) et WIP1 déphosphorylent RelA directement au niveau du résidu S536. L'action de PP2A sur S536 inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B. Une autre phosphatase, PP4, a un rôle inhibiteur via son action sur le résidu thréonine 435 (T435). L'autre modification post-traductionnelle de NF- $\kappa$ B est l'acétylation. L'acétylation se produit via les enzymes acétyle-transférases qui ajoutent le groupement acétyle sur les résidus lysine. Il existe sept résidus de lysine qui subissent une acétylation via les enzymes acétyle-transférases. La plupart des résidus lysine peuvent être acétylés via p300/CBP, lorsque les résidus comme K122 et K123 sont acétylés via PCAF (p300/CBP associated factor). L'acétylation des différents résidus lysine peut également réguler l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B de différentes manières : soit en augmentant ou diminuant la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN, ou à I $\kappa$ B. Les enzymes désacétylases comme HDAC1, HDAC3 et SIRT1 sont impliquées dans la régulation de ce processus. HDAC3 peut désacétyler la plupart des résidus lysine, lorsque HDAC1 et SIRT1 désacétylent K310. La méthylation des lysines est également une modification post-traductionnelle importante de NF- $\kappa$ B permettant de moduler l'activité transcriptionnelle. Les résidus lysine peuvent être mono-, bi- et tri-méthylés. Il existe deux méthyltransférases SET9 (suppressor of variegation-enhancer of zeste-trithorax) et NSD1 (nuclear receptor binding SET domain protein 1). SET9 ajoute le groupement méthyle sur les résidus lysine K37, K314 et K315, lorsque NSD1 ajoute un groupement méthyle à K218 et deux groupement méthyle à K221. Les résidus lysine méthylés via NSD1 sont déméthylés via FBXL11 (F-box and leucin-rich repeat protein).

Interactions de NF-κB avec d'autres voies de signalisation :

NF-κB peut interagir avec de nombreuses voies de signalisation. L'activation de NF-κB peut résulter de l'interaction avec plusieurs voies de signalisation liées à différentes kinases comme MEKK1, MEKK2, MEKK3, TAK, NIK, GSK3β, PKAc, PIM1, CKII, TBK1,PKCc (Hayden and Ghosh, 2004)

Les fonctions de NF-κB dépendent de son interaction avec plusieurs autres facteurs de transcription. Ainsi, la coopération de NF-κB et STAT3 (signal transducters and activators of transcription) régule différents gènes cibles anti-apoptotiques, et du cycle cellulaire, ainsi que des gènes codant les chimokines et cytokines. La coopération entre NF-κB et p53 est nécessaire pour l'activation de NF-κB après certaines stimulations, par exemple lors de l'activation par le TNF-α. (Hoesel and Schmid, 2013)

Les recherches récentes sur les lignées de cancers de la prostate montrent une corrélation entre l'activité accrue de NF-κB avec un autre facteur de transcription appelé ERG (ETS(erythroblast transformation- specific)-related gene). ERG peut aussi jouer un rôle dans l'expression de certains gènes cibles de NF-κB – ICAM1 dans les cellules endothéliales et dans les métastases en stimulant CXCR4/CXCL12 (Chemokine C-X-C motif receptor/Chemokine ligand) (Cai et al., 2010)

NF-κB peut réguler l'expression des gènes de certains miRNA : miR-9, miR-21, miR-143, miR-146 et miR-224. NF-κB peut aussi induire la synthèse de certaines protéines impliquées dans la régulation des miRNA. (Hoesel and Schmid, 2013)

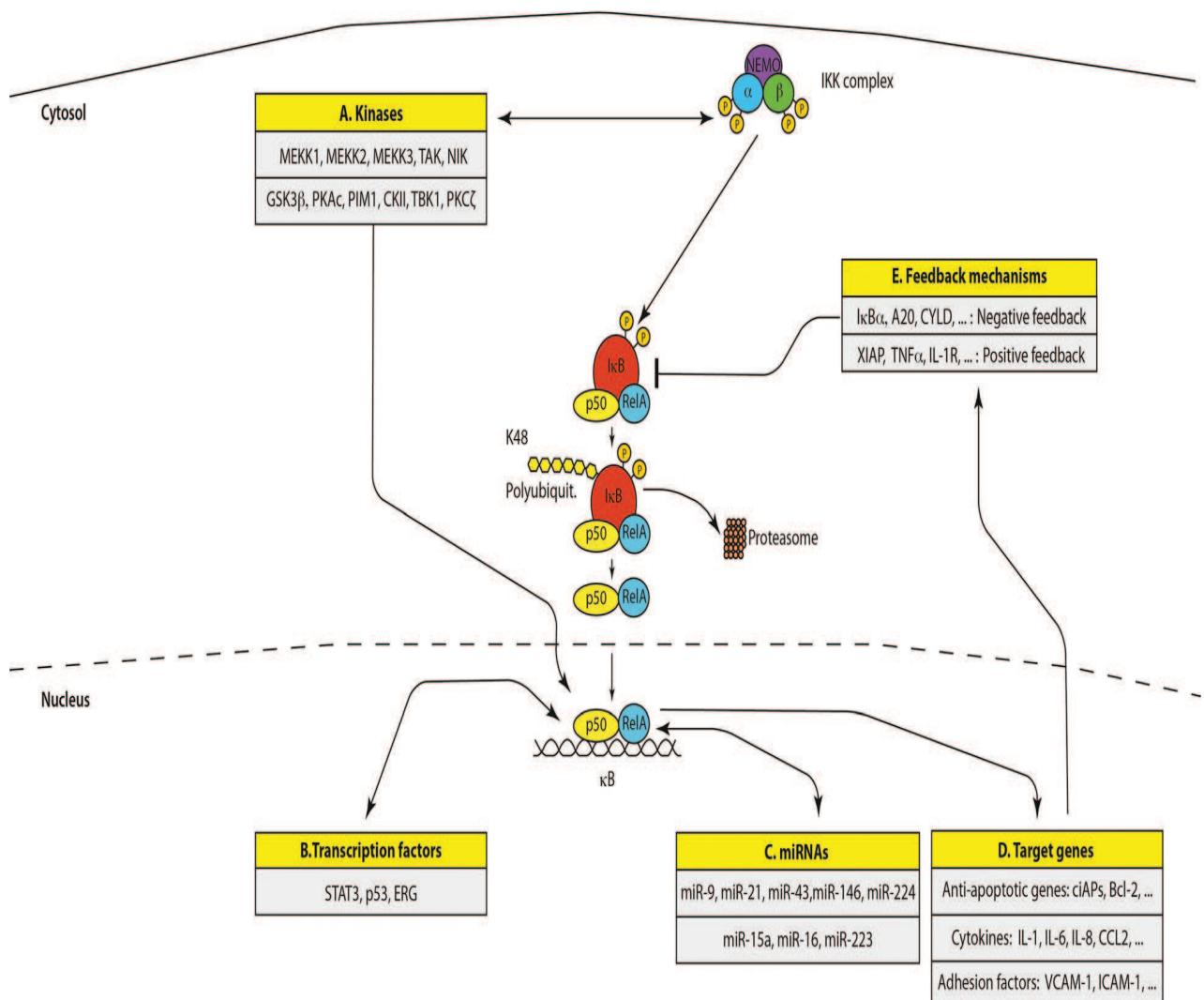


Figure 21 : L'interaction entre la voie canonique de NF-κB et différents processus de signalisation.

(A) Différentes kinases peuvent phosphoryler et activer les sous-unités IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  du complexe d'IKK ou augmenter l'activité transcriptionnelle de NF-κB comme: GSK3 $\beta$ , Protein kinase B (PKB ou Akt), Protein kinase R (PKR), PKC, Mitogen-Activated Type 3-Protein Kinase 7 (MAP3K7 ou TAK1), p38 MAP kinases ou JNKs (c-JUN N-terminal kinases).

(B) Les différents facteurs de transcription comme p53, ERG ou STAT3 peuvent influencer l'activité transcriptionnelle de NF-κB ou activer directement la transcription des gènes régulés via NF-κB.

(C) Les miRNA peuvent être les gènes cibles des voies de la signalisation de NF-κB ou affecter l'expression des membres de la famille de NF-κB ou les molécules effectrices de la voie de NF-κB.

(D) Les gènes anti-apoptotiques appartiennent aux gènes cibles de NF-κB, par exemple, les gènes des protéines BIRC (Baculoviral IAP(inhibitor of apoptosis) repeat-containing proteins) et de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Aussi, les cytokines comme IL-1, IL-6, IL-8 et les facteurs d'adhésion VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), ICAM-1 sont les gènes cibles de NF-κB.

(E) Les mécanismes de rétrocontrôle peuvent réguler l'activité de NF-κB positivement et négativement : les molécules de rétrocontrôle positif sont XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), TNF- $\alpha$  et IL-1R, lorsque les molécules de rétrocontrôle négatif sont IκB $\alpha$ , CYLD (Cylindromatosis) et A20. (Hoesel and Schmid, 2013)

NF-κB régule ses inhibiteurs positivement pour générer un rétrocontrôle négatif dépendant par exemple de IκB $\alpha$ . Ainsi, dès que NF-κB exerce son activité transcriptionnelle, IκB $\alpha$  entre dans le noyau, favorise le déplacement de la liaison à l'ADN et le transfert

cytoplasmique de NF-κB. Par ailleurs, les régulateurs négatifs de la signalisation de NF-κB comme A20 et CYLD sont régulés positivement par NF-κB. Les enzymes déubiquitinases sont les régulateurs négatifs de NF-κB et ont un rôle critique dans cette régulation. Par exemple, l'ablation génétique de la protéine A20 cause une inflammation dans de multiples organes. La mutation ou la délétion de TNFAIP3(tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3) qui code A20 est associée à la dérégulation de la signalisation de NF-κB dans plusieurs lymphomes. Les polymorphismes de TNFAIP3 sont associés au lupus érythémateux systémique.

CYLD est aussi un suppresseur de tumeur qui régule négativement la signalisation de NF-κB via dé-ubiquitylation et la régulation de la distribution nucléaire ou cytoplasmique de NF-κB. Certaines mutations causant la perte d'expression de CYLD sont impliquées dans les carcinomes colorectaux, hépatocellulaires, rénaux et dans le myélome (Hoesel and Schmid, 2013).

La suppression d'IKK $\beta$  dans les cellules épithéliales intestinales (IECS : intestinal epithelial cells) renforce l'apoptose indépendante de p53/JNK dans des tumeurs précoces ce qui conduit à l'élimination des entérocytes en voie de transformation et diminue l'incidence des tumeurs (Egan et al., 2004).

#### Principales fonctions de NF-κB:

NF-κB est impliqué dans la régulation de nombreuses réponses biologiques. L'activité de NF-κB est importante pour la régulation des réponses immunologiques, l'inflammation et la régulation de la survie cellulaire. NF-κB a un rôle indispensable dans l'oncogenèse en régulant l'expression de gènes impliqués dans différents processus comme la prolifération, l'invasion, la métastase etc.

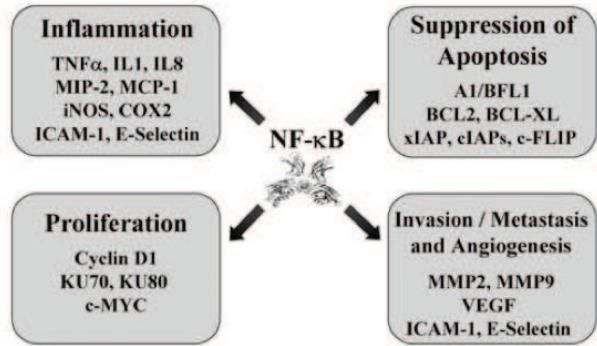


Figure 22 : Les gènes NF-κB dépendants.

La représentation des gènes NF-κB-dépendants impliqués dans différents aspects de l'oncogénese. (Kim et al., 2006)

NF-κB peut activer l'expression de certains gènes impliqués dans la suppression de la mort cellulaire via les deux mécanismes : intrinsèque et extrinsèque. La résistance à l'apoptose peut impliquer l'activation d'expression des facteurs anti-apoptotique comme Bcl-2, Bcl-XL(B-cell lymphoma-extra large) ou la perte d'expression ou la mutation des facteurs pro-apoptotiques comme p53. NF-κB intervient dans la régulation des gènes du VEGF qui contribuent à l'angiogenèse. NF-κB est aussi impliqué dans l'invasion en intervenant dans l'expression des gènes des molécules d'adhésion et d'intégrines, et les protéases extracellulaires comme MMP2 et MMP9.

## *IKK $\epsilon$*

I-kappa-B kinase epsilon (IKK $\epsilon$  ou IKKi) est un membre de la famille des kinases d'IKK contenant cinq membres : IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ , IKK $\epsilon$  et TBK1 (Chau et al., 2008). IKK $\epsilon$  est une nouvelle kinase du complexe d'IkB, décrit pour la première fois par Shimada et ses collègues (Shimada et al., 1999). Elle est exprimée dans différents tissus comme le pancréas, la rate, le thymus, les leucocytes et les LT (Shimada et al., 1999). Dans les autres types cellulaires (comme les fibroblastes) IKK $\epsilon$  est surexprimée rapidement via les cytokines (TNF, IL-1, IK6, IFN- $\gamma$ ), les produits microbiens (LPS, ARN viral) et la PMA, d'où son nom d'IKK inducible (IKKi) (Verhelst et al., 2013).

### Structure d'IKK $\epsilon$

Le gène IKK $\epsilon$  est localisé sur le chromosome 1 et est constitué de 26.638 bases de nucléotides (start : 206.643.586bp, end : 206.670.223bp). L'analyse de la séquence nucléotidique d'IKK $\epsilon$  par MatInspector montre les éléments majeurs du promoteur comme TATA-box (de - 608 à - 592), CCAAT-box (de - 1732 à - 1722, de - 1606 à - 1596, de - 559 à - 549), GC - box (de - 1637 à - 1623, de - 892 à - 878, de - 887 à - 873, de - 510 à - 496) etc. IKK $\epsilon$  possède 2 isoformes d'épissage alternatif nommés Q14164-1 et Q14164-2 (d'après [www.genecards.org](http://www.genecards.org)). La protéine correspondante à l'isoforme 1 est constituée de 716 acides aminés et celle de l'isoforme 2 de 631 acides aminés.

-1976 GATGGG ATGCCACCT TTACATCCTG AGCACACAGT GCCTGCCTCA TAGCAGGTGC TAGACACATG  
 -1910 GTAGTTTCT TTGAATGTGC TAAATATGCT GGGAAAGAGA TTGACGGAGA GAGGAAAGTA AGAGTGCTGG  
     kB  
 -1840 TGAGGACCCA GCAGGTTCAT CAGGGAAAAA AGTGGGTAAA CATTACGGAT TGTCTAAGTT ATGTAGCAA  
 -1770 CCTCGGTGCC CTAAAGCAAC AAGGGCTGAT TTCTCACCAA AGCCAAATGTC CCTTGTTGGAC CAGCAGGGGA  
     CCAAT-Box  
 -1700 ACTCTGCTCA GGACAGTCAC TCAAGGACCC AGACTAACAG AATCACACTG CCAGAAAGCA GAGTTCTGGG  
 -1630 AGGGTCTGC ATCAGGAAAT AATGCTTTG GTGGGAACT CACATGCTCC CCCTATCACA AAGTAACATAG  
     GC-Box   C/EBP           CCAAT-Box  
 -1560 GATGTGCAGT TCTCCCATGT GCCAGGCAGG CAGAAACCTG GGAAGACTAG GCTGGGTGCA GTGGCTCAGC  
 -1490 CCTGTAATCC CGGCACCTTG GGAGACTGAG GCAGGTGGAT CAGGAGGTTG GGAGATCTAG ACCAACCTGC  
 -1420 TCAATCCACC TCACCAACCA CACAGTGAAA CCCCCATCTCT ACTAAAAATA CAAAAAAATTA GCCACTGGCT  
 -1350 CACGCCCTGTA ATCCCCGCAC TTTGGGAGGC TGAGGCAGGT GGATCAGGAG GTGGGAGAT CAAGTCCAAC  
 -1280 CTGTTCAATC CACCTCACCA ACCACACAGT GAAACCCCAT CTCTACTAAA AATACAAAAA GTTAGCCGGG  
 -1210 CATGGTGGTG CRTGCCTGTA GTCCCAGATA CTTGGGAGGC TGAGGCAGAA GAATCACTTG AACCCAGGAG  
 -1140 GTGGAGGTTG CAGTGAGCTA ACATCATGCC ACTGCACTCC AGCCTGGGTG ACAGAGTGAG ACTCCATCTC  
 -1070 AAAAAAAAGA AGCAAGCTGG GAAGACTGGG TGGAACATGA GGATCTCAGG CACTCAGGCA CATTCCTCCT  
 -1000 GGTCTGTATG TGAGAAGTTG CAGCAACTCC TCCAGCTGGA GGTGTTATGG GGAGTTCTCT TTATCTGAGC  
 -930 ACTAGGCAGT TCTCAGCTCT GCTCTGTTC TAGTGTCACT GTGGGAGGG TGGGGCTGGC GGAGGAAGACC  
     GC-Box           GC-Box  
 -860 ACCAGGTGTG GCCATGGAA AGTCCCTCCA ACATTCTATA GAAACATGGA ATTCTCTGGT TTTAACCAATT  
     kB  
 -790 TCATATCCAA CTGCCATCTC TGAGCTGACC AGAGCAGGAC AGACCCCTCC AGCCTCTAG GACATTGAT  
 -720 GTGGGGCCTC GAGTCCTGGC TGGGAAGTTG GCACCTGGGT GCCAGCCCCA GCAGTCTCTG AAGAGCATGG  
 -650 GTAAATTACT GAAGTGTGTG GGCCTCCATG CTTCAATGC CTTCTGTAA AATGCTTTCC AAGCTCCCAA  
     TATA-Box  
 -580 ACAATTCCAA ATATATCCAT GTCATCCAAT CAACCCACAG AGTAGCTGTT ACTCTGCGGG TGAGTGAGCT  
     CCAAT-Box  
 -510 GGCTGGGAGG GGCTGCATGC TGTGTGCTCA GGTCACACTG GAGGGCATCA GCTGGGTCCC CGCGCTTGCT  
     GC-Box  
 -440 CTCGGACCTC TGCAGGCCTC CTGGGAAGGT GACTCAGATC CAACTTCTAG GACTGGATCG GCATAGCTCC  
     AP1  
 -370 CACACTTCCT TGGGGTTCCCT GGGTGTGGGA GCATGGACTT CCCAGGCAGC TTTCCACTTA GTTAACTTG  
     C/EBP  
 -300 CCAACCTGCT CTGTTGACTC TGGGAAGAGC CCTGAACCTTC CCTGCTCCAG TGAACGTGAG GAGATGCCAA  
     kB  
 -230 AACAGCACCC AGCTGCCAT CAAGATTACC AGAAGGGCCC CAGTTCTGG CTTCTCTGTG GCTCACACTC  
 -160 TGGTCCTATT GCCTACCCCTT GGGAACTCAG AGCATCCCTCT TTCTCTTTTC TGCTGAGCTG GTGGCTGCAC  
 -90 CGAGTTGCCCT CTGTCCTCTT AAGAGAGAAA GAGAGAGCGA GAGACGGAAA TCAGGAAGTG CGAGAGAGCT  
     TSS  
     +1  
 -20 GAGAGCCAGG ACTCAGTGCT GAGCTTGGTG TCCCACCGCC ACAAGGGAGGC AGGGAAAGAAA CCCACTAGTC  
 +51 CCAGCTCTG GGGTGGCACA GACATTGCAA CTGGCCCTGC CTGTGGGTCC TAGGGGCCCT TGGCTACCAAG  
 +121 GAGGCTAAGA ACAGTGCTCA TGAATGACAG TGAGCCCTGA ARGCTCTGGG GGTGTACCCC AGTCCCACAA  
     Intron1  
 +191 GCCTGCATCC CCTGCAGTGG AGATGGG-----CTC AGCTCCTGGA CGTGCCACAG ACAGAAAGCA  
     Intron2  
 +251 TAACATACAC TCGCCAGGAA GAGCCTTTGC CTGACTCAGG GCAGCTCAGA GTGTGGG-----GCA  
 +311 GAGGGTGAAC AGCCAGCTCA GGGCAGGAGA TG

Figure 23 : Séquence nucléotidique représentant le promoteur et la 5'UTR (Un Translated Region) du gène IKK $\epsilon$  humain.

Le site du codon start est marqué +1. Les paires de bases avant le codon start sont marquées en nombres négatifs, celles d'après sont marquées en tant que nombres positifs. Les éléments de réponse aux cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) sont soulignés (Wang et al., 2005).

Les kinases des I $\kappa$ Bs ont une organisation structurale protéique comprenant des domaines KD(kinase domain), ULD (ubiquitin-like domain) et SDD (a-helical scaffold/dimerisation domain) (Xu et al., 2011). Les kinases IKK-liées ont un domaine kinase N-terminal, un domaine Leucine Zipper en C-terminal et un domaine HLH impliqué dans la régulation de l'activité phosphotransferasique. Le domaine kinase d'IKK $\epsilon$  possède 33% d'identité avec IKK $\alpha$  et 31% avec IKK $\beta$  (Servant et al., 2010) et 27% d'identité avec chaque

kinase pour sa séquence complète. IKK $\epsilon$  et TBK1 partagent 64% d'identité et IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  partagent 52% d'identité.

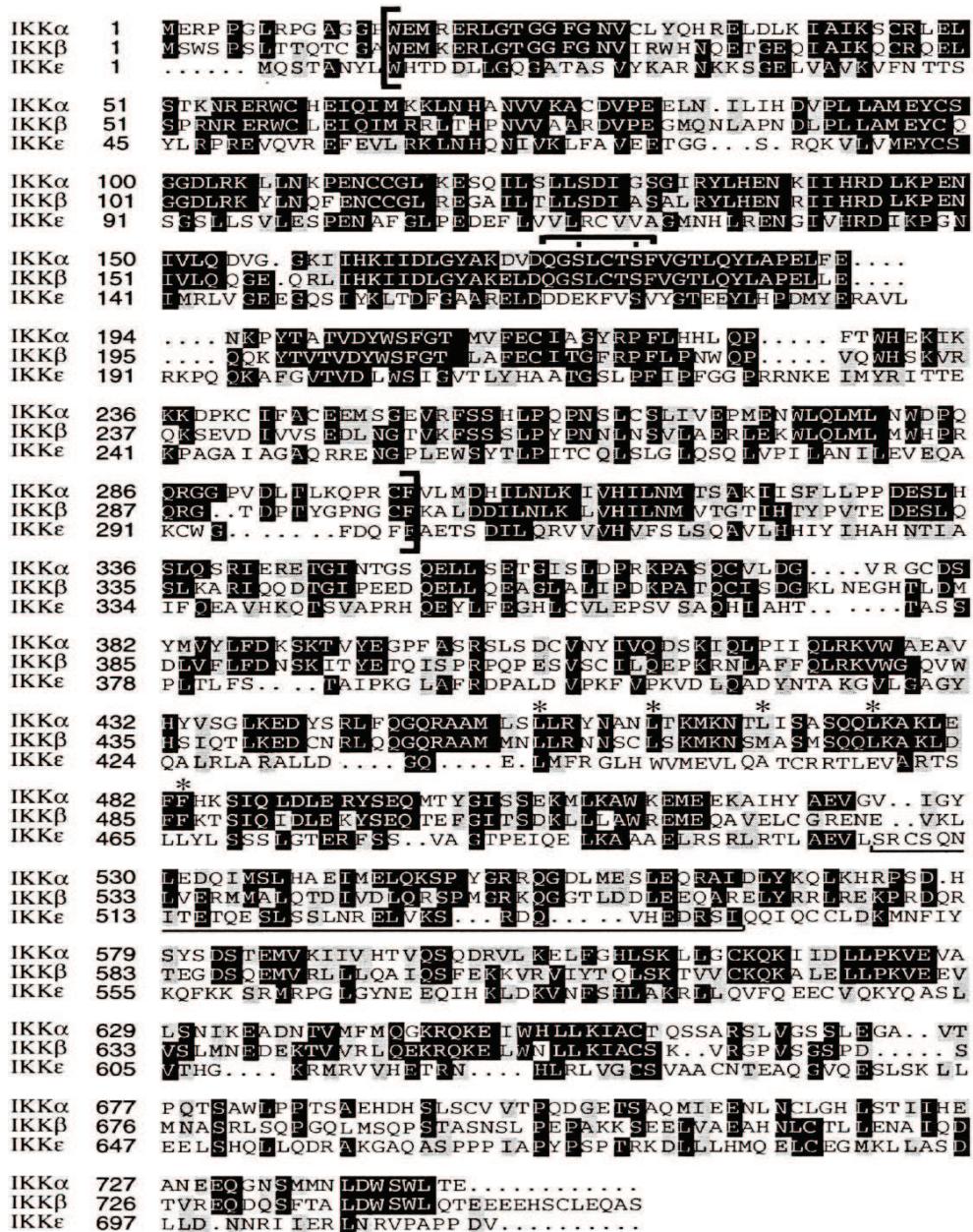
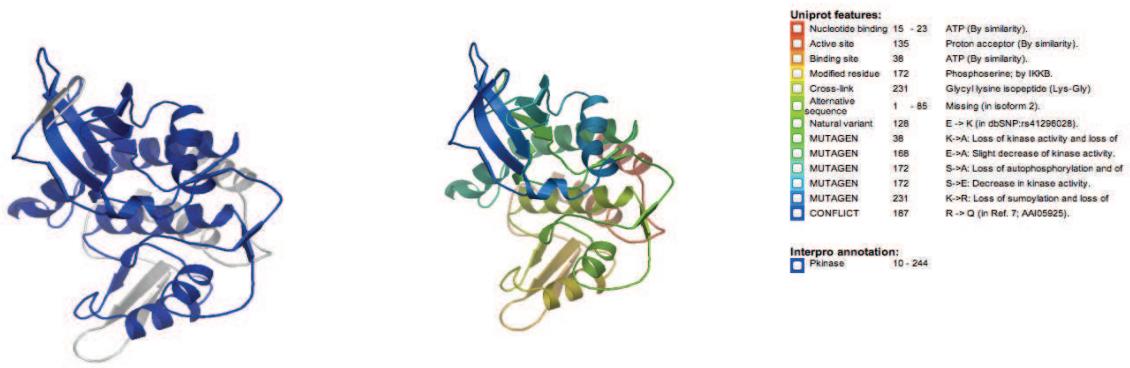


Figure 24 : Alignement des séquences polypeptidiques d'IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et IKK $\epsilon$ .

*Alignement des séquences peptidiques d'IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et IKK $\epsilon$  : les résidus identiques sont montrés en noir, les parenthèses verticales indiquent les domaines kinases et les parenthèses horizontales indiquent la boucle d'activation des IKKs. Les résidus sérine sont marqués par des points et les étoiles indiquent les résidus importants de motif de Leucine Zipper d'IKK $\alpha$  et d'IKK $\beta$ . Et le domaine de multimérisation d'IKK $\epsilon$  (domaine Coiled-coil) est souligné (Peters et al., 2000).*

Dans cette figure, nous observons les différents domaines d'IKK $\epsilon$  selon leur fonction.

Le domaine kinase représente la partie majeure de la structure 3D d'IKK $\epsilon$ , qui correspond à la séquence polypeptidique de 10 à 244 acides amines.



**Figure 25 : Structure 3D d'IKK $\epsilon$ .**

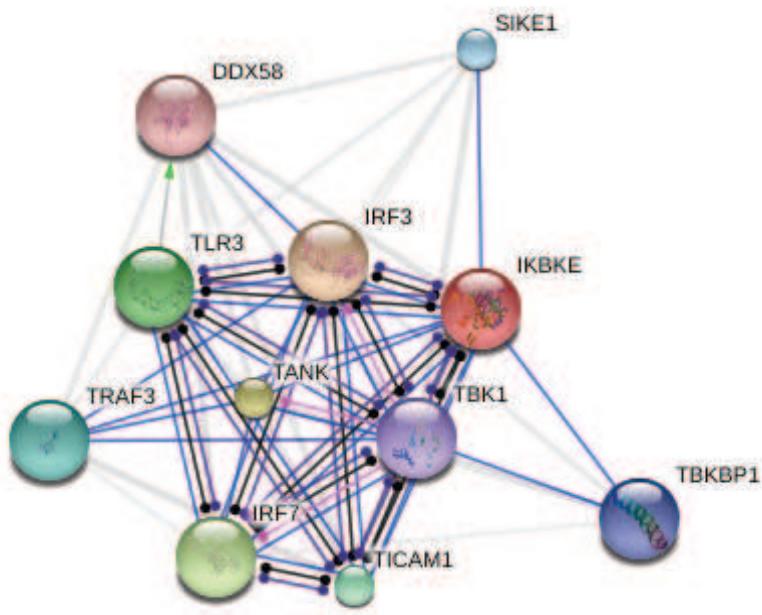
IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  sont les sous-unités catalytiques du complexe IKK (Israël, 2000). IKK $\alpha$  est nécessaire à la maturation de la protéine p100 et joue un rôle important dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B en activant la phosphorylation de p65 (O'Mahony et al., 2004). IKK $\beta$  est essentielle à l'activation du complexe IKK et à la phosphorylation d'IkB $\beta$  par les cytokines pro-inflammatoires (Zandi and Karin, 1999). IKK $\gamma$  est la sous-unité régulatrice du complexe IKK (Yamaoka et al., 1998). IKK $\epsilon$  est un homologue d'IKK $\alpha$  et d'IKK $\beta$ , elle phosphoryle I kB $\alpha$  seulement sur la serine 36 (Peters et al., 2000).

#### Régulation et fonction d'IKK $\epsilon$

Le rôle d'IKK $\epsilon$  dans l'oncogenèse, les réponses immunitaires, l'apoptose etc. est assuré via son action sur ses cibles en impliquant différentes voies de signalisation. IKK $\epsilon$  peut être induite par le LPS (Shimada et al., 1999), les cytokines pro-inflammatoires (Kravchenko et al., 2003) etc. Il existe des nombreuses cibles d'IKK $\epsilon$ , dont certaines sont communes avec les autres IKK (IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ ). Mais, STAT1, RelA/p65 et p100/p52 sont les cibles spécifiques activées via IKK $\epsilon$  (Servant et al., 2010). IKK $\epsilon$  peut interagir avec plusieurs protéines comme MAVS/IPS1, AZI2, SIKE1, TICAM1/TRIF, IRF3, DDX58/RIG-I, TOPORS, CYLD ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)). IKK $\epsilon$  a des interactions positives ou négatives avec plusieurs protéines pour exercer son rôle dans les différents processus biologiques. Les candidats les plus connus pour l'interaction avec IKK $\epsilon$  sont les suivants :

- IRF3 : intervient dans l'activation des promoteurs d'ISRE (interferon-stimulated response element). Il joue un rôle dans l'activité antivirale.

- TANK (TRAF family member associated NF-κB activator) fonctionne comme un régulateur de TRAF en le gardant dans un état inactif.
- IRF7 est un facteur de transcription impliqué dans l'activité antivirale et qui est activé via phosphorylation en réponse aux infections.
- TLR3 participe dans la réponse immunitaire innée aux agents microbiens et viraux. Il agit via MYD88 et TRAF6, ce qui conduit à l'activation de NF-κB, à la sécrétion des cytokines et à la réponse inflammatoire.
- TICAM1 (Toll-IL-1-receptor Containing Adaptar Molecule 1) est impliqué dans l'immunité innée contre les pathogènes. Il est impliqué dans l'activation d'IRF et de NF-κB via TLR3 et TLR4, et dans l'apoptose.
- TRAF3 est une protéine adaptatrice et traductrice de signal qui associe les membres de la famille TNF aux différentes voies de signalisations. Elle est impliquée dans l'activation de NF-κB et de JNK.
- SIKE1 (suppressor of IKBKE1) est un suppresseur physiologique d'IKKε et de TBK1. Il inhibe la voie d'activation d'IRF3 via les virus ou TLR3. Il s'agit d'un rétrocontrôle négatif.
- TBKBP1 (Tank Binding Kinase 1 binding protein 1) est une protéine adaptatrice qui se lie constitutivement à TBK1 et à IKBKE et joue un rôle dans l'immunité innée antivirale.
- TBK1 est une protéine sérine/thréonine, et un homologue d'IKKε, qui joue un rôle essentiel dans la transcription des gènes induit via TNF-α.
- DDX58 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58) est impliqué dans la défense immunitaire innée contre les virus. L'interaction avec les ARNdb(double stranded RNA) produits pendant la réplication virale, déclenche la traduction de la cascade impliquant MAVS/IPS1 (Mitochondrial antiviral-signaling protein/ IFN-β promoter stimulator 1), qui résulte en l'activation de NF-κB, de IRF3 et d'IRF7 et à l'induction des cytokines antivirales comme IFN-β, CCL5/RANTES (Chemokine (C-C motif) ligand 5 / regulated on activation, normal T cell expressed and secreted).



**Figure 26 : Interactions possibles avec IKK $\epsilon$ .**

([www.string90.embl.de/](http://www.string90.embl.de/)).

#### Implication d'IKK $\epsilon$ dans l'activation de NF- $\kappa$ B

Il existe des nombreux agents capables d'activer NF- $\kappa$ B par le complexe IKK. Les mieux caractérisés sont les TNF et IL-1 $\beta$ . La liaison de l'IL-1 $\beta$  à IL-1R conduit à la formation d'un complexe entre l'IL-1R et IL-1RAcP, ce qui déclenche à son tour l'assemblage d'un complexe de signalisation sous-membranaire contenant MyD88, IRAK, et TRAF6 (Cao et al., 1996). TRAF6 est un transducteur de signal dans la voie NF- $\kappa$ B qui va activer les IKK. Mais, la traduction des signaux vers le complexe IKK par TRAF6 et autres n'est pas compris. En revanche, on sait que IKK est activé par TRAF6 via un mécanisme impliquant les chaînes de polyUb K63-liés, mais pas la dégradation protéasomique (Deng et al., 2000). De plus, il a été montré que l'ablation génétique de TRAF6 abolit complètement l'activation des IKK en réponse aux IL-1 $\beta$ , CD40 et LPS (Lomaga et al., 1999).

L'activité kinase d'IKK $\alpha$  et d'IKK $\beta$  est stimulée par TNF- $\alpha$  ou IL-1, par contre l'autophosphorylation d'IKK $\epsilon$  et son activité kinase ne sont pas améliorées par ces cytokines. D'après Shimada, l'expression d'IKK $\epsilon$  est principalement régulée au niveau des mARN, en sachant que la surexpression d'IKK $\epsilon$  est suffisante pour son autophosphorylation, comme

pour l'activation de NF-κB. IKK $\epsilon$  est donc considérée comme la seule IKK dont l'activité est régulée par son expression (Shimada et al., 1999). En même temps, il a été montré que la forme rendue inactive par mutation d'IKK $\epsilon$  bloque l'induction de NF-κB par PMA (Phorbol ester) ou lors de l'activation par le TCR, mais pas par le TNF-α ou l'IL-1 (Peters et al., 2000).

Le TNF induit l'activation de NF-κB via la voie canonique, par phosphorylation de TRAF2 (Sérine11) par l'intermédiaire de IKK $\epsilon$  (Shen et al., 2012). IKK $\epsilon$  joue aussi un rôle dans l'activation de RelA par la voie non canonique. IKK $\epsilon$  peut provoquer l'expression des gènes via transactivation de p52, mais ce processus est indirect et requiert la présence de RelA phosphorylé via IKK $\epsilon$  (Wietek et al., 2006). IKK $\epsilon$  peut aussi activer NF-κB par phosphorylation de la protéine associée à la CYLD. CYLD est une enzyme de désubiquitination impliquée dans la régulation négative de l'activité de NF-κB. Cette régulation passe par la protéolyse d'ubiquitine liée à K63 à partir de constituants de signalisations proximales de NF-κB tels que le récepteur TRAF2, TRAF6, et IKK $\gamma$ . IKK $\epsilon$  activée phosphoryle CYLD en S418, ce qui aboutit à la diminution de son activité deubiquitinase (Hutti et al., 2009). Habituellement, CYLD inhibe TRAF6, TRAF7 (Yoshida et al., 2005). Les souris déficientes en CYLD montrent une incidence élevée de colites inflammatoires et de cancers colorectaux associés à cette inflammation, probablement causée par une production accrue de NF-κB par les cytokines pro-inflammatoires issues des macrophages (Zhang et al., 2006).

#### Implication d'IKK $\epsilon$ dans l'activation des STATs

STAT1 induit la mort des cellules tumorales via la régulation transcriptionnelle des gènes codants pour les protéines comme: les récepteurs de mort, les caspases, iNOS, Bcl-XL, p21 (Bowman et al., 2000)(Bromberg and Darnell, 2000)(Kim et al., 2007). IKK $\epsilon$  induit la phosphorylation de STAT1 suite à son induction par l'IFN-β (Tenoever et al., 2007). IKK $\epsilon$  a un rôle régulateur des réponses à l'IFN-I et l'IFN-II ainsi dans la balance entre l'immunité innée et adaptative. Suite à une infection virale, l'IFN-I (IFN-α et IFN-β) induit la formation du complexe ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) composé de: STAT1, STAT2 et IRF9 via la phosphorylation de STAT1 par IKK $\epsilon$ . L'IFN-II est impliqué dans la formation du complexe GAF (gamma-activated complex) impliqué dans l'activation de l'expression des gènes antiviraux via l'induction d'homodimérisation de STAT1. Mais, quand STAT1 est phosphorylé via IKK $\epsilon$ , l'état de phosphorylation de STAT1 inhibe l'homodimérisation de cette protéine et la

formation du complexe GAF. Donc, l'activation d'IKK $\epsilon$  via un virus ou/et l'IFN-I, supprime l'expression des gènes dépendant du complexe GAF et favorise l'expression des gènes nécessitant la présence du complexe ISGF3. Par conséquent, en cas d'absence d'IKK $\epsilon$  la transcription de GAF est augmenté et rend les cellules résistantes aux infections (Ng et al., 2011a).

#### Implication d'IKK $\epsilon$ dans l'activation des IRFs

IKK $\epsilon$  et TBK1 (les kinases IKK-liées) sont des composants des kinases activées via le TLRs, qui phosphorylent IRF-3 et IRF-7, ce qui permet de souligner son rôle dans le déclenchement de la réponse antivirale (Sharma et al., 2003). La phosphorylation d'IRF-3 et d'IRF-7 se fait aux résidus C-terminal (Chau et al., 2008), (Sharma et al., 2003) (Joo et al., 2007). La voie d'activation de TLR3 via les ARNdb et de TLR4 via le LPS abouti à l'expression des gènes IFN-induits et requiert la participation de TRIF mais pas de MYD88. En effet, MYD88 est impliqué dans la voie de signalisation activant NF- $\kappa$ B. (Hemmi et al., 2004) (Fitzgerald et al., 2003). La phosphorylation d'IRF3 et d'IRF7 via le complexe kinase IKK $\epsilon$ /TBK1 requiert aussi la présence de plusieurs protéines comme: NAP1 (or AZI2 : 5-azacytidine-induced protein 2), TANK, DDX3, SINTBAD(or TBKBP1 : tumor necrosis factor family member-associated NF-  $\kappa$ B activator binding kinase 1 binding protein) , IKK $\gamma$ , TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein) et TRAF (Bowie and Unterholzner, 2008) (Gatot et al., 2007). TRAF3/6 se lie directement avec TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) après son activation et induit la phosphorylation d'IRF3 et d'IRF7 (Häcker et al., 2006). TRAF6 interagit avec TRIF via son domaine TRAF et le N-terminale de TRIF contenant les motifs pour la liaison de TRAF6 (Sato et al., 2003). NAP1 (TBK ou T2K) est une sous-unité régulatrice des kinases IKK-liées, elle joue un rôle dans l'activation de NF- $\kappa$ B (Fujita et al., 2003). Ainsi, elle participe à la phosphorylation d'IRF3 lors de l'activation de TLR3 (Sasai et al., 2005). La phosphorylation et l'activation d'IRF-7, via IKK $\epsilon$ /TBK1, a un rôle essentiel dans la régulation de l'immunité innée et dans la transition de l'immunité innée à l'immunité adaptative (Honda et al., 2005). Une autre voie qui résulte de l' activation d'IRF-3, d'IRF-7 et de NF- $\kappa$ B via le complexe IKK $\epsilon$ /TBK1 est la voie qui passe par RLRS (RIG-I (retinoic acid inducible gene 1)-like receptor) et MAVS(Lazear et al., 2013). Les protéines DEAD box sont caractérisées via le motif Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD), et sont les ARN-hélicases impliquées dans plusieurs processus cellulaires qui

entraînent la liaison à l'ARN et l'altération de la structure secondaire de l'ARN. RIG-I est codé par le gène DDX58 et contient les motifs ARN-Helicases Dead Box et un domaine CARD (caspase recrutement domain). RIG-I est impliqué dans la reconnaissance de l'ARNdb viral et dans la régulation des réponses immunitaires ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)).

SIKE est un suppresseur d'IKK $\epsilon$ /TBK1. SIKE est associé à TBK1 dans les conditions physiologiques, mais lors d'infections virales ou lors de stimulation TLR3, il y a dissociation de SIKE et de TBK1. Dans la voie d'activation d'IRF3 par des virus ou par TLR3, la surexpression de SIKE perturbe les interactions d'IKK $\epsilon$ , ou celles de TBK1, avec les composants de cette voie comme: TRIF, RIG-I, et IRF-3 (Huang et al., 2005). Au contraire des cellules déficientes en TBK1, les cellules déficientes en IKK $\epsilon$  produisent normalement l'IFN (Hemmi et al., 2004). IKK a deux différents épissages alternatifs: IKK $\epsilon$  sv1 et IKK $\epsilon$  sv2. Aucun des variants d'épissage n'active IRF3, ils forment des dimères avec IKK $\epsilon$  WT et inhibent l'activation de IRF3 par IKK $\epsilon$ . IKK $\epsilon$  sv1 active toujours NF- $\kappa$ B, par contre IKK $\epsilon$  sv2 est défectueux dans l'activation de NF- $\kappa$ B (Koop et al., 2011).

#### Implication d'IKK $\epsilon$ dans l'inactivation de FOXO3

Les protéines FOX (Forkhead box) sont une famille de régulateurs de transcription définie par un domaine de liaison à l'ADN commun appelle « forkhead box ». Plusieurs sous-familles de Fox tels que FoxO, FoxM, FoxP, FoxC et FoxA ont été liées à la tumorigenèse et la progression de certains cancers. Il y a quatre membres de la famille FoxO chez les humains, FOXO1, FOXO3, FOXO4 et FOXO6. Pourtant ces facteur de transcription sont encore très peu étudiés (Myatt and Lam, 2007).

FOXO3 (connu aussi comme FOXO3a) est un facteur de transcription impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN, l'apoptose et le cycle cellulaire. FOXO3 est connu comme le suppresseur de tumeur, et sa dérégulation est impliquée dans la tumorigenèse. La diminution de l'activité de FOXO3 est observée dans divers cancers et souvent liée à l'augmentation de l'activité Akt résultant de la perte de PTEN. En effet lors de la phosphorylation par Akt, FOXO3 subi la translocation extra-nucléaire (Skurk et al., 2004) (Finnberg and El-Deiry, 2004). FOXO3 joue aussi le rôle de déclencheur pour l'apoptose. En effet, il augmente l'expression de gènes important pour l'induction de la mort cellulaire

comme Bim et PUMA et diminue des protéines anti-apoptotiques comme FLIP (FLICE-inhibitory protein)(Ekoff et al., 2007)(Skurk et al., 2004).

IKK $\epsilon$  phosphoryle et inactive FOXO3 (Forkhead box O3, facteur de transcription de la survie cellulaire) en réponse aux agonistes de TLR4. Inversement, FOXO3 est aussi capable d'antagoniser l'activité de NF- $\kappa$ B (surexpression de I $\kappa$ B directement ou indirectement) et IRFs (INF regulator factor). La plupart des gènes impliqués dans la prolifération et la régularisation du cycle cellulaire sont inhibés par FOXO3. Ce processus n'est pas dépendant de l'interaction de FOXO3 avec l'ADN, mais plutôt de son interaction avec un facteur de transcription comme p53 et  $\beta$ -caténine.

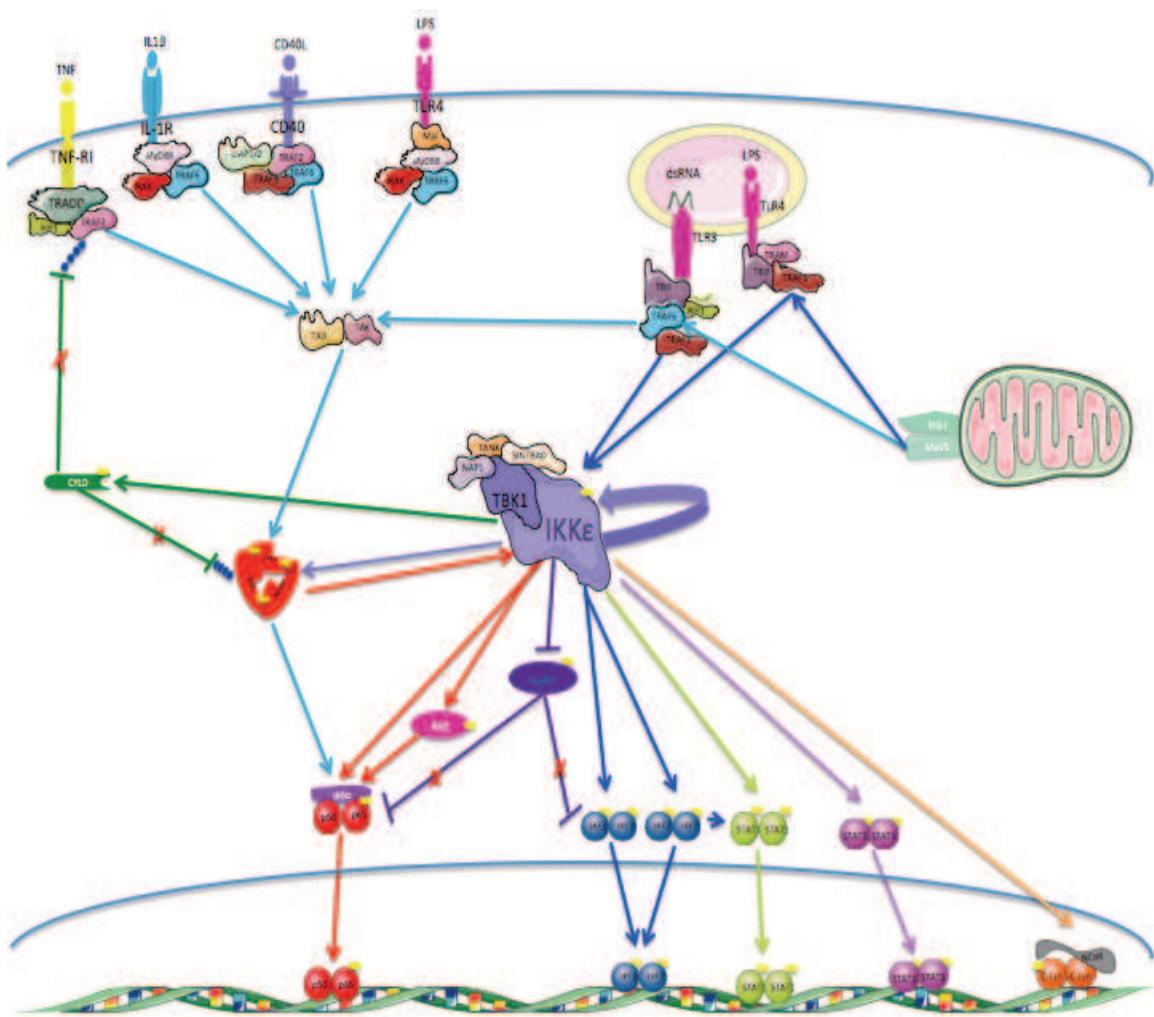


Figure 27 : Régulation et fonctions d'IKK $\epsilon$ .

La surexpression d'IKK $\epsilon$  dans les cellules tumorales induit la survie, la transformation et la prolifération cellulaire via différents mécanismes impliquant la phosphorylation de substrats spécifiques par IKK $\epsilon$ . IKK $\epsilon$  peut phosphoryler NF-κB directement ou indirectement (via phosphorylation et activation d'AKT), ce qui résulte à l'expression des gènes NF-κB dépendants. De même, IKK $\epsilon$  phosphoryle et inactive CYLD, en inhibant sa capacité de déubiquitinase pour les substrats spécifiques, impliqués dans la voie de signalisation de NF-κB. La phosphorylation de TRAF2 par IKK $\epsilon$  active sa capacité E3-ubiquitine ligase. Donc, la phosphorylation de CYLD et de TRAF2 par IKK $\epsilon$ , augmente la signalisation de NF-κB d'une manière ubiquitine dépendante. IKK $\epsilon$  augmente le potentiel inducteur de STAT1 pour ses gènes cibles, par sa phosphorylation. Les kinases IKK-liées (IKK $\epsilon$  et TBK1) peuvent s'autoactiver et aussi être activée via IKK $\alpha/\beta$ . L'activation canonique des kinases a lieu via la liaison des ligands avec les récepteurs spécifiques (TNF-R1, IL-1R, TLR4, RIG-I), ce qui déclenche le recrutement des protéines adaptatrices (Mal, MyD88, TRAM, TRIF, MAVS). Il en résulte la dégradation de IκB $\alpha$  via les kinases IKK $\alpha/\beta$  et conduit à la libération des hétérodimères p50/p65, qui ensuite subissent la translocation nucléaire. Il existe une réciprocité entre l'activation des voies canoniques et non-canoniques. L'activation canonique d'IKK $\alpha/\beta$  peut activer IKK $\epsilon$  qui à son tour est capable d'activer IKK $\alpha/\beta$ . L'autoactivation d'IKK $\epsilon$ /TBK1 est TRAF dépendante. En effet, la signalisation TRIF-dépendante pour TLR3 et TLR4, ainsi que la signalisation dépendante de MAVS pour RIG-I, induit l'autoactivation d'IKK $\epsilon$ /TBK1 via TRAF3. Ce processus requiert l'interaction d'IKK $\epsilon$ /TBK1 avec les différentes protéines chaperonnes (TANK, NAP1, SINTBAD). La coopération d'IKK $\epsilon$ /TBK1 avec les protéines chaperonnes est impliquée dans différentes activités :

- ✓ IKK $\epsilon$ /TBK1 peut être impliquée dans l'activation de l'expression des gènes cibles NF-κB dépendants via la phosphorylation d'IκB $\alpha$  ou via la phosphorylation d'IKK $\alpha/\beta$ ;
- ✓ IKK $\epsilon$ /TBK1 peut phosphoryler IRF3 (aussi IRF7), en menant à son homodimérisation et à sa translocation nucléaire ;
- ✓ IKK $\epsilon$ /TBK1 peut phosphoryler c-Jun en contribuant à la libération de NCoR (nuclear repressor complex).

### Rôle d'IKK $\epsilon$ en cancérologie

Des études récentes montrent le rôle d'IKK $\epsilon$  dans l'oncogenèse, Eddy et ses collègues ont montré la surexpression d'IKK $\epsilon$  pour la première fois dans le cancer du sein. Pourtant, elle est exprimée faiblement par les cellules saine (Eddy et al., 2005). Ensuite, plusieurs études ont montré le rôle d'IKK $\epsilon$  dans l'oncogenèse de divers cancers comme : le cancer de sein (Boehm et al., 2007), le cancer de la prostate (Péant et al., 2009), le cancer ovarien (Hsu et al., 2012)(Guo et al., 2009), le gliome (Li et al., 2012c) et l'adénocarcinome (Cheng et al., 2011a). Il a été montré, dans le cancer du sein, que l'inhibition du gène IKK $\epsilon$  par siARN inhibe l'invasion et la prolifération des cellules cancéreuses (Qin and Cheng, 2010). IKK $\epsilon$  induit l'oncogenèse des cancer de la prostate par la sécrétion de cytokines inflammatoires comme IL-6 et IL-8 (Péant et al., 2009). IKK $\epsilon$  augmente la progression et le développement des cellules du cancer du sein via la signalisation médiée par ERa-36 (Li et al., 2013). Une recherche plus récente a été réalisée en 2012 par Sarah et ses collègues, qui ont montré que l'expression d'IKK $\epsilon$  est corrélée avec l'invasion, les métastases, et le stade tumorale des cancers ovariens (Hsu et al., 2012). On peut suggérer que la dérégulation de l'expression d'IKK $\epsilon$  se déroule au niveau transcriptionnel et/ou traductionnel. En effet, dans les cancers l'augmentation de l'expression d'IKK $\epsilon$  au niveau protéique est beaucoup plus importante que son amplification au niveau de l'ADN (Guo et al., 2009) (Guo et al., 2010).

IKK $\epsilon$  et TBK1 sont impliqués dans la transformation oncogénique RAS-dépendante. L'implication de TBK1 dans cette transformation requiert la présence d'un effecteur de Ras nommé Ral-GEF (Ral-guanine nucleotide exchange factor). Lorsque la transformation est induite par IKK $\epsilon$ , cela passe par l'activation de la voie PI3K-Akt et implique un autre effecteur de RAS nommé P110 (avec ses isoformes a, b, d et y).

### Fonctions dans l'apoptose :

MacKelgan et ses collègues ont montré que l'inhibition d'IKK $\epsilon$  induit l'apoptose dans la lignée cellulaire Hela (MacKeigan et al., 2005). Ensuite, il a été montré l'impact de l'inhibition d'IKK $\epsilon$  via shARN pour ralentir la prolifération cellulaire des cellules du cancer ovarien et des cellules Hela (Adli and Baldwin, 2006) (Guo et al., 2009). IKK $\epsilon$  a aussi un impact sur le cycle cellulaire, son inhibition via shARN induit l'arrêt du cycle cellulaire à la

phase G0/G1 à cause de la régulation négative de la cycline D1 (Qin and Cheng, 2010). Il a été montré que la surexpression d'IKK $\epsilon$  est corrélée à la résistance au cisplatine. Lors du traitement d'une lignée de cancer ovarien, avec du cisplatine, une augmentation significative de l'apoptose a été montrée sur les lignées bloquées pour IKK $\epsilon$  par rapport aux cellules contrôles (Guo et al., 2009), (Qin and Cheng, 2010). Au contraire la surexpression d'IKK $\epsilon$  mediée par un virus, provoque la libération mitochondriale du cytochrome-c et l'apoptose. IKK $\epsilon$  phosphoryle XIAP au Ser430 (antagoniste potentiel des caspases -3, -7 et -9) ce qui conduit à sa dégradation protéasomique, et par conséquent, au déclenchement de l'apoptose. La phosphorylation de XIAP régule son interaction avec IRF3, ce qui suggère son rôle dans l'apoptose médiée par IRF3-Bax (Nakhaei et al., 2012).

KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) est un proto-oncogène qui est muté dans de nombreux cancers, dont la plupart sont agressifs et répondent mal aux traitements. La suppression de TBK1 induit spécifiquement l'apoptose dans les cancers qui expriment k-Ras. Les signaux anti-apoptotiques de NF- $\kappa$ B, activé via TBK1, impliquent c-Rel et Bcl-XL, et sont essentiels pour la survie. TBK1 et NF- $\kappa$ B sont essentiels dans les tumeurs k-ras mutées et présentent une approche générale pour l'identification de voies co-dépendantes dans les cancers (Zhu et al., 2014).

Depuis la découverte de TBK1 et d'IKK $\epsilon$ , une caractérisation des voies de signalisation conduisant à l'activation d'IRF-3 et d'IRF-7 a conduit à l'identification de plusieurs protéines chaperonnes régulant l'activité phosphotransférase de ses deux kinases, dont DDX3 fait partie. Induction de l'activité promotrice de DDX3 ramène à l'activation des voies TBK1/IKK $\epsilon$ /IRF3 et ainsi DDX3 stimule les réponses immunitaires innées par l'induction d'IFN- $\beta$  via TBK1/IKK $\epsilon$  (Soulat et al., 2008)(Choi et al., 2014). DDX3 joue aussi un rôle dans l'apoptose. En effet DDX3 associé à p53 induit l'accumulation de p53 dans le noyau suite à un dommage à l'ADN et régule positivement l'apoptose dans les cellules exprimant le p53 fonctionnel. Au contraire, dans les cellules exprimant la forme mutée de p53, DDX3 inhibe l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose pour réduire l'activation de la caspase-7 (Sun et al., 2013b). Le rôle de DDX3 dans l'induction de la TEM via Snail a été montré par la même équipe (Sun et al., 2011).

# OBJECTIFS

Les cellules du système immunitaire sont programmées pour reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses, pourtant les cellules tumorales ont la capacité de mettre en œuvre les divers moyens pour échapper à la mort induite par les effecteurs du système immunitaire. Au cours de cette thèse, nous avons étudié plus particulièrement PD-L1, qui est impliqué dans la protection des cellules tumorales contre une attaque du système immunitaire. Auparavant, plusieurs équipes ont montré l'induction de PD-L1 dans divers cancers (cancer du poumon, cancer du colon, cancer ovarien, cancer du pancréas, cancer du sein, mélanome, leucémie etc.) et que les niveaux élevés de PD-L1 sont liés à un mauvais pronostique.

Cependant, aucune étude n'avait encore montré le lien entre l'induction de PD-L1 et l'induction de la TEM. Ainsi, les objectifs de cette thèse ont été l'analyse des mécanismes de l'induction de PD-L1 au cours de la TEM.

Comme notre travail de thèse s'est organisé sur l'étude du rôle de la TEM dans l'invasion tumorale, nous avons tout d'abord souhaité obtenir un modèle réversible de TEM. Le but de travailler avec un tel modèle était de voir les modifications au cours de la TEM, ainsi qu'au cours de la MET ; ce qui nous permettrait de mettre en évidence les changements spécifiques à la TEM et de comparer la reconnaissance des même cellules dans un aspect épithélial ou mésenchymateux par les effecteurs du système immunitaire. Dans notre projet, nous avons utilisé la lignée de cancer pulmonaire A549 dont l'exposition aux cytokines inflammatoires permet l'induction de la TEM de manière réversible, sachant que dans l'organisme les cellules cancéreuses sont capables de relâcher des cytokines immunosuppressives et inductrices de la TEM. Nous avons ainsi validé ce modèle *in vitro* de TEM inductible avec la combinaison des cytokines TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ . Cela nous a permis de voir au cours de la TEM l'induction de PD-L1 connue pour sa capacité à réduire la prolifération des

LT CD8<sup>+</sup> via la formation du complexe PD-1 /PD-L1, qui va transmettre un signal d'inhibition. Nos objectifs de travail étaient de voir par quels mécanismes les cellules cancéreuses arrivent à induire l'expression de PD-L1 au cours de la TEM.

# INTRODUCTION A LA PUBLICATION

Plusieurs études ont auparavant montré la TEM comme un facteur de mauvais pronostique. Notre équipe s'intéressant particulièrement aux liens entre la TEM et l'immuno-évasion des cancers, nous avons commencé par l'étude des récepteurs de mort, des divers ligands pour des récepteurs activateurs des cellules NK et des molécules inhibitrices pour les LT dans le contexte de la TEM induite dans le cas du cancer du poumon. Nous avons choisi d'explorer au cours de notre travail la régulation de PD-L1, dont l'induction était plus flagrante au cours de la TEM induite avec la combinaison des cytokines TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ . En parcourant la littérature relative à l'expression de PD-L1, nous avons vu que son induction était corrélée à un mauvais pronostique dans le cas de nombreux cancers, tandis qu'aucune étude n'a montré le rôle de la TEM dans son induction. Comme l'induction de PD-L1 n'était pas observée dans le cas du traitement individuel avec les cytokines TNF- $\alpha$  ou TGF- $\beta$ , mais seulement dans le cas de l'induction de la TEM lors de la combinaison de ces deux cytokines ; nous avons commencé par explorer le rôle des facteurs de transcription spécifiques de la TEM dans l'induction de PD-L1 grâce à une technique de transfert de gène. Les résultats obtenus nous montraient l'insuffisance de ces facteurs de transcription dans l'induction de PD-L1 dans ce modèle. Nous avons, à partir de ce moment, réorienté notre travail vers l'étude des mécanismes d'induction de PD-L1. Auparavant, des études montraient déjà l'implication directe d'IRF1 et de NF- $\kappa$ B dans la régulation de PD-L1 via la fixation sur son promoteur. Nos études se sont donc, naturellement penchées sur l'implication de ces protéines dans le mécanisme générale d'induction de PD-L1. Nos travaux ont montré que IRF1 et RelA ne semblent pas impliqués dans la régulation de PD-L1 lors de la TEM. Nous avons ensuite analysé l'influence de IKK $\epsilon$ , déjà décrite comme un oncogène

dans le cas de nombreux cancers et sous-unité de la famille NF-κB. L'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques d'IKK $\epsilon$ , ainsi que l'induction d'IKK $\epsilon$  par la technique de transfert de gène nous témoigne de son implication dans la régulation de PD-L1. Ce travail fait l'objet d'un article scientifique dans *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* en 2015. (Asgarova et al., "Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) regulates PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: a role for IKK $\epsilon$ ", *en soumission.*)



# RESULTATS



# **Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) regulates PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: a role for IKK $\epsilon$ .**

Asgarova A<sup>1-3</sup>, Asgarov K<sup>1-3</sup>, Galaine J<sup>1-3</sup>, Guenat D<sup>1-4</sup>, Mougey V<sup>1-4</sup>, Queiroz L<sup>1-4</sup>, Pallandre JR<sup>1-3</sup>, Bouard A<sup>1-3</sup>, Balland J<sup>1-3</sup>, Adotevi O<sup>1-3</sup>, Godet Y<sup>1-3</sup>, Hervouet E<sup>3</sup>, Borg C<sup>1-5</sup>.

<sup>1</sup> INSERM unit 1098, 8 rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod BP 1937 25020 Besançon Cedex France.

<sup>2</sup> Clinical Investigation center-Biotherapy, 3 bd Fleming, F-25030 Besançon Cedex, France

<sup>3</sup> University of Franche Comté, Besançon, France

<sup>4</sup> Etablissement Français du Sang, UMR1098, 8 rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod BP 1937 25020 Besançon Cedex France.

<sup>5</sup> University Hospital of Besançon, Department of Medical Oncology, 3 bd Fleming, F-25030 Besançon Cedex, France

Corresponding author: Christophe Borg, 8, rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod BP 1937 25020 Besançon Cedex France. Tel : 33 3 81 66 93 21 ; fax : 33 3 81 66 97 08 ; email : [christophe.borg@efs.sante.fr](mailto:christophe.borg@efs.sante.fr)

**Keywords:** epithelial-mesenchymal transition; IKK $\epsilon$ ; NF- $\kappa$ B; death receptors; PD-L1; A549; lung cancer, cancer

Figure 1. A549 model.

Figure 2. Regulation of death receptors and immune checkpoint inhibitors on A549 during EMT.

Figure 3. TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 cooperate to promote PD-L1 expression during EMT(reversible).

Figure 4. PD-L1 expression is not regulated by conventional EMT transcriptional regulators in A549.

Figure 5. Influence of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1-mediated EMT on NF $\kappa$ -B signaling.

Figure 6. Role of IKK $\epsilon$  in the regulation of PD-L1 by EMT in A549.

**Abstract:**

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a factor of poor prognosis in several cancers. Tumor cells, which undergo EMT acquire increased capacities of proliferation, invasion and have the ability to generate metastases. Invading cells must escape the immune system during their systemic migration, before metastasis initiation. To escape the immune system, cancer cells may induce tolerance or resist destruction by immune effectors via multiple mechanisms such as: release of inhibitory proteins (IL-10, TGF, HLA-G), expression of immune checkpoint inhibitors (PDL-1, Gal-9), loss of NK cell receptor activating ligands (ULBPs, MICA/B) or Major Histocompatibility Complex, decrease of death receptors (DR4, DR5, Fas). We hypothesized that EMT might control immune checkpoint inhibitors, then promoting immune evasion. In the current study, we investigated the regulation of PD-L1 during EMT in non-small cell lung carcinoma (NSCLC). EMT was generated in A549 NSCLC cell line by exposition to TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. Death receptor (DR4, DR5 and Fas) and ligands (FasL and TRAIL) expression were not modified during EMT process. Similarly, EMT did not influence the levels of NK cell activating or inhibitory molecules. By contrast, PD-L1 but not PD-L2 nor galectin 9 expressions was up-regulated during cytokine-driven EMT in a reversible manner. The EMT-related transcription factors Snail and Zeb1 were not involved in PD-L1 regulation. Then, we analyzed the role of NF- $\kappa$ B. The induction of EMT in A549 enhanced the expression of IKK $\epsilon$  in a TNF- $\alpha$  dependent fashion. Using two different pharmacological inhibitors and IKK $\epsilon$  siRNA, we evidenced a role of this molecular pathway in PD-L1 regulation.

**Count:**

Title: 15 words

Abstract: 250 words

Text: 2902 words (excluding abstract, legends and references)

Pages: 31

Figures: 6

References: 56

## Introduction

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a highly conserved cellular process that allows epithelial cells to convert to mesenchymal cells (Kalluri and Weinberg, 2009). The loss of E-cadherin expression is a crucial step in EMT and a hallmark of mesenchymal phenotype, whereas Vimentin is a canonical marker for detecting fully transitioned epithelial cells and acquisition of fibroblastic-like phenotype. EMT is involved in different physio-pathological contexts including: embryonic and organ development (type 1 EMT), tissue regeneration and fibrosis (type 2 EMT), or carcinoma progression (type 3 EMT) (Kalluri and Weinberg, 2009). Several signaling pathways contribute to EMT regulation (Thiery et al., 2009). Oncogenesis, hypoxia or exposition to chronic inflammation are the main environmental conditions promoting the ability of tumor cells to undergo EMT (López-Novoa and Nieto, 2009). TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , HGF, EGF, PDGF, Wnt or NOTCH ligands are soluble factors which can control mesenchymal phenotype acquisition during cancer progression (Thiery and Sleeman, 2006) (Heldin et al., 2012). The acquisition of a complete mesenchymal program relies on the expression of specific transcription factors such as Zeb, Snail, Slug, Twist, which repress E-cadherin, induce the transcription of molecules involved in cytoskeleton regulation and promote secretion of metalloproteinase and invasion (Garg, 2013). Tumor cells, which undergo EMT, acquire capacities of proliferation, migration and resistance to apoptosis. By co-opting a program involved in embryonic development, carcinoma cells are able to invade normal tissues and to induce metastases. EMT also confers to carcinoma cells, stem cell like properties indispensable to clonal expansion and initiation of metastases (Scheel and Weinberg, 2012). Altogether, EMT is one of the major molecular mechanisms carried out during oncogenesis to enable cancer progression. One crucial step of oncogenesis is the acquisition by cancer cells of the ability to evade the immune system (Hanahan and Weinberg, 2011) (Gajewski et al., 2013). Recent clinical advances in immunotherapy demonstrated that some cancers with established lymphocyte infiltrates, express immune checkpoint inhibitory molecules, such as PD-L1, to allow their progression. Several studies suggested that PD-L1 status may be a new predictor of poor prognosis for patients with lung cancers (Chen et al., 2009), (Chen et al., 2012c), (Shi et al., 2013). In these patients, treatment with anti-PD-L1 or anti-PD-1 restored effective antitumor immunity and induced long lasting objective responses, demonstrating the pivotal role of such immune inhibitory signaling in oncogenesis.

Then, we hypothesized that the expression of immune checkpoint inhibitors might be specifically regulated during EMT to allow invasion and immune escape. To investigate this issue, we selected a model of reversible EMT based on TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 treatment of the cell line A549. Expression of death receptors or ligands, NK cell activating or inhibitory molecules, as well as immune checkpoint inhibitors were analyzed according the EMT status. We observed that induced EMT in NSCLC does not modify NK cell activating or inhibitory molecules as well as death receptors or ligands. By contrast, we showed that PD-L1 was up-regulated during EMT in a reversible manner. PD-L1 expression was not correlated to EMT specific transcription factors, STAT1 or canonical NF- $\kappa$ B pathways. By contrast, we evidenced that the control of PD-L1 expression during EMT involved IKK $\varepsilon$ .

## Results

### Regulation of death receptors and NK cell-activating molecules on A549 during EMT.

In order to assess how EMT influences the recognition of tumor cells by lymphocytes during invasion, we selected a reversible model of EMT. In vitro induction of epithelial-mesenchymal transition in A549 cell line has been reported previously (Kasai et al., 2005), (Liu, 2008), (Yamauchi et al., 2010), (Kawata et al., 2012), (Saito et al., 2013). For this purpose, A549 cell line was exposed to TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 during 5 days. This treatment allowed this epithelial cell line to acquire the feature of mesenchymal tumor cells (Figure 1A). Removal of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 led to the restoration of an epithelial phenotype within 5 days (Figure 1A). The EMT status was confirmed by western blotting showing that TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 treatment repressed E-cadherin and induced overexpression of Vimentin (Figure 1B). Losses of E-cadherin and of the membrane distribution of  $\beta$ -catenin were also confirmed by confocal microscopy (Figure 1C). Similarly, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 induced a reversible loss of EPCAM (Figure 1D). EMT phenotype conferred by exposition to cytokine combination was also associated with an enhanced invasive capacity of A549 compared to the invasion ability of A549 exposed to TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta$ 1 alone (Figure 1E).

Effector immune cells can eliminate carcinoma cells throughout different mechanisms: one of these mechanisms is the production of pro-apoptotic ligands, which belong to the tumor-necrosis factor (TNF) superfamily. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas ligand (FasL) are two of these pro-apoptotic ligands. They trigger extrinsic apoptosis through the activation of “death receptors”, Death Receptor 4 (DR4) / Death Receptor (DR5) and Fas, respectively. Then, we first assessed the expression of DR4, DR5 and Fas on A549 exposed or not to TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. We could observe that DR and Fas expressions were not significantly modified during the acquisition of mesenchymal phenotype by A549 (Figure 2A). Another mechanism involved in the eradication of tumor cells during

immunosurveillance is the recognition of NKG2D-ligand by CD8 T lymphocytes or NK cells (Deng et al., 2015), (Diefenbach et al., 2000), (Diefenbach et al., 2001), (Groh et al., 2002). (Diefenbach et al., 2003). Accordingly, previous experiments were reproduced and the expression of NKG2D ligands was assessed by flow cytometry. TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 did not influence the expression of the NKG2D ligands MICA, MICB, ULBP1-3 (Figure 2B). Of note, we did not observe in these experiments any significant modification in MHC class I (Figure 2B) or HLA-G expression (Figure S1A). Moreover, the modulation of molecules regulating the recognition of tumor cells by NK was unlikely. Indeed, a 5 days TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 treatment of A549 during 5 days did not hampered the capacity of activated NK to recognize and kill A549 nor to produce IFN- $\gamma$  following cocultures with this cell line (Figure S1B).

*Role of Cytokine-mediated EMT in immune checkpoint inhibitor regulation on A549.*

The next set of experiments was performed to investigate the modulation of TIM03 and PD-1 ligands in A549 according to EMT status. Flow cytometry experiments showed that TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 treatment did not influence the expression of the TIM03 ligands Galectine 9 or CEACAM1 (CD66), while EMT induction, as monitored by the loss of EPCAM, led to the up-regulation of PD-L1 (Figure 3A). PD-L2 was not expressed in this model (Figure 3A). PD-L1 expression disappeared after removal of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 (Figure 3A). The regulation of PD-L1 by exposition to TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 involved pdl1 transcription as confirmed using RT-PCR (Figure 3B). These results indicate that cytokine-mediated EMT promotes the expression of PD-L1.

*TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 cooperate to promote PD-L1 expression during EMT*

We next sought to determine which of TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta$ 1 signaling contributes to the regulation of PD-L1. For this purpose, A549 cells were treated with TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 or with

the combination during 5 days. As previously described (Liu, 2008), (Yamauchi et al., 2010), (Saito et al., 2013), TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta$ 1 treatment alone failed to drive the mesenchymal transformation of A549 in short term cultures (Figure 3C). Moreover, treatment with each cytokine alone, used during 5-14 days, was not able to induce PD-L1 expression. By contrast, only cytokine combination promoted significant PD-L1 expression (Figure 3C).

*PD-L1 expression is not regulated by conventional EMT transcriptional regulators in A549*

The increased transcription of PD-L1 during cytokine-induced EMT, prompted us to characterize the expression of EMT-related transcriptional regulators in A549. Western blotting experiments showed an increased expression of main transcription factors of EMT, Zeb1 and Snail in A549 treated by TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 (Figure 4A). RT-PCR analyses confirmed the expression of Snail and Zeb1 in A549 (Figure 4B). Of note, TNF- $\alpha$  alone increased Zeb1 while TGF- $\beta$ 1 exposition enhanced Snail expression ruling out a direct role of these transcriptional modulators in PD-L1 regulation (Figure 4A). Moreover, Snail transfection in A549 did not induce PD-L1 even when this cell line was exposed to TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta$ 1 (Figure 4C).

*Influence of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1-mediated EMT on NF $\kappa$ B signaling*

In order to decipher the mechanisms implicated in the control of PD-L1 during cytokine-induced EMT, we first analyzed the transcription factor DNA binding sites within PD-L1 promoter using matinspector. NF- $\kappa$ B was the main transcription factor, previously described as promoting EMT (Huber et al., 2004), (Radisky and Bissell, 2007), (Cheng et al., 2011b), (Li et al., 2012b), (Kumar et al., 2013) and displaying a binding site in PD-L1 promoter. Then, we decided to characterize NF- $\kappa$ B unit expression during cytokine-induced EMT in A549. We could observe an increase of p52 NF- $\kappa$ B sub-unit in mesenchymal cells while RelA expression was not significantly modified. We also identified an increase of the non-canonical IKK $\epsilon$  proteins (Figure 5A). Of note, we also observed that exposition to TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1

did not promote RelA nuclear translocation (Figure S2A). Consequently, the next set of experiments was designed to investigate the role of p52 NF- $\kappa$ B sub-unit in the control of PD-L1 during EMT. JSH23, a pharmacological inhibitor of p52, was used to prevent p52 expression in A549 cells treated with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. JSH-23 selectively blocks nuclear translocation of active NF- $\kappa$ B without affecting the process of I $\kappa$ B degradation and suppress its binding to the DNA consensus sequence (Shin et al., 2004), (Kumar et al., 2011). As previously described, JSH23 inhibited the induction of NF- $\kappa$ B in A549 following cytokine-induced EMT (Figure 5B). Nevertheless, JSH23 did not prevent PD-L1 expression in these experiments (Figure 5C). A potential role of p52 NF- $\kappa$ B subunit was also excluded since transfection of p52 (Figure 5D) did not modify the expression of PD-L1 in A549 cultured in complete medium, as well as in cultures containing TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta$ 1 (Figure 5E). Altogether, these experiments ruled out a potential role of p52 NF- $\kappa$ B subunit in PD-L1 regulation during cytokine-mediated EMT.

#### *Role of IKK $\epsilon$ in the regulation of PD-L1 by EMT in A549*

Since previous experiments unraveled an increased expression of IKK $\epsilon$  in A549 treated with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1, the role of this signaling pathway in PD-L1 expression was investigated. Accordingly, IKK $\epsilon$  was genetically transferred into A549 cancer cell lines (Figure 6A). Overexpression of IKK $\epsilon$  sustained the up-regulation of PD-L1 in A549 treated with TNF- $\alpha$  but not in steady state conditions and not after exposition to TGF- $\beta$ 1 (Figure 6B). The precise role of IKK $\epsilon$  was further analyzed using two different IKK $\epsilon$  pharmacological inhibitors. A549 cells were treated with BX795 and MRT67307 before exposition to TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 during 5 days. Both IKK $\epsilon$  pharmacological inhibitors prevented PD-L1 expression after TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 treatment (Figure 6C). Moreover, similar results were achieved using IKK $\epsilon$  specific siRNA (Figure 6D).

## Discussion

EMT is a complex reprogramming of epithelial cells playing a pivotal role in tumor invasion, acquisition of stemness properties and metastasis development. In the present study, we questioned the influence of EMT in PD-L1 regulation.

EMT is controlled by transcriptional repressors recruited to the E-box elements of E-cadherin promoter. We selected a model where EMT can be induced in a reversible manner in order to mimic the invasion phase leading to metastasis formation. As previously described, we observed that TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 synergized to promote EMT of A549. In this model, (Kumar et al., 2013) Snail and Zeb1 were overexpressed in A549 following TGF- $\beta$ 1 used alone or in combination with TNF- $\alpha$  (Figure 4A and B). In the present study, we showed that EMT phenotype conferred by TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  to A549 was associated with the up-regulation of PD-L1, in line with the requirement for an invading tumor cell to evade the immune system. Of note, exposition to TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta$ 1 alone did not induce a significant expression of PD-L1. Moreover, snail transfection did not promote PD-L1 on A549, suggesting that a synergism between TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  signalling rather than a direct impact of EMT-derived transcription factors might be required to control PD-L1 in this setting.

Hypoxia, interactions with stromal cells such as cancer associated fibroblasts and mesenchymal stem cells, or inflammation are elements of the tumor microenvironment promoting EMT (Thiery and Sleeman, 2006). Among growth-factors and cytokines involved in this dedifferentiation process, TGF- $\beta$ 1 was shown to be of particular importance (Xu et al., 2009), (Korkaya et al., 2011). Indeed, TGF- $\beta$ 1 controls the expression of EMT-related transcription factors such as SNAIL, ZEB and TWIST1 (Xu et al., 2009).

TNF- $\alpha$  is another cytokine produced by hematopoietic cells such as M2 macrophages within tumor microenvironment and exerting a promoting role on EMT (Gao et al., 2012) (Scheel et

al., 2011). TNF- $\alpha$  stimulates nuclear factor kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$ B) in cancer cells and potentiates the ability of TGF- $\beta$ 1 to induce EMT (Scheel et al., 2011) (Kawata et al., 2012).

NF- $\kappa$ B transcription factor family is composed of 5 subunits: RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p105/p50), NF- $\kappa$ B2 (p100/p52). NF- $\kappa$ B signaling is an important component of the molecular network induced by inflammation in cancer cells (Karin, 2006). Indeed, Huber MA et al showed that NF- $\kappa$ B signaling is required for initiation and maintenance of TGF- $\beta$ 1 driven EMT in breast carcinoma (Huber et al., 2004). In this model, I $\kappa$ kB promotes TWIST1 expression leading to the acquisition of EMT phenotype and cancer stem cell properties. It was also previously reported in A549 model, that mesenchymal NSCLC display a constitutively active NF- $\kappa$ B signaling (Kumar et al., 2013). Then, the role of NF- $\kappa$ B in PD-L1 regulation was addressed. We first observed that cytokine-driven EMT increased NF- $\kappa$ B2 (p100/p52) in A549, but not RelA (Figure 5). Nevertheless, NF- $\kappa$ B2 pharmacological inhibition or genetic transfer did not influence the regulation of PD-L1 (Figure 5).

I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  is a non-canonical IKK, which plays a pivotal role as a regulator of innate immunity. Known functions of IKK $\epsilon$  include the modulation of NF- $\kappa$ B and interferon signaling after pattern recognition receptor activation (Ng et al., 2011b). Moreover, IKK $\epsilon$  activation might also results from Toll-like receptor independent mechanisms (Hutti et al., 2009) and contributes to bridge inflammation and oncogenesis (Shen and Hahn, 2011). IKK $\epsilon$  was overexpressed in cytokine-induced EMT in our study (Figure 5).

It was previously established that the role of IKK $\epsilon$  in antiviral responses requires serine 708 phosphorylation of STAT1 (Tenoever et al., 2007). It was further evidenced that IKK $\epsilon$  phosphorylates serine residues of IRF1 and IRF3 to promote their nuclear translocation and transcriptional activity (Fitzgerald et al., 2003) (Hemmi et al., 2004).

The regulation of PD-L1 expression became an issue of growing importance regarding the clinical results achieved with anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy (Pardoll, 2012), (Brahmer et

al., 2012), (Topalian et al., 2012), (Drake et al., 2014) (Nguyen and Ohashi, 2015). While PD-L2 is mostly expressed on dendritic cells and macrophages, PD-L1 expression was reported on tumor cells (Dong et al., 1999), (Freeman et al., 2000) (Tseng et al., 2001) (Latchman et al., 2001) but also on myeloid cells infiltrating cancer microenvironment (Noman et al., 2014). PD-L1 promoter contains hypoxia-response element and HIF-1 $\alpha$  but not HIF-2 $\alpha$  promotes PD-L1 expression in tumor microenvironment (Noman et al., 2014). The transcription of PD-L1 is also up-regulated by IFN- $\gamma$  in a STAT1/3 dependent fashion (Loke and Allison, 2003). Furthermore, IRF-1 is required for the constitutive and IFN- $\gamma$  inducible PD-L1 expression (Lee et al., 2006a).

Silencing of IRF-1 transcription inhibits PD-L1 and PD-L2 induction during DC maturation, while leaving unaltered MHC class II and levels of costimulatory molecules (Martínez et al., 2014).

Here, we did not observe any influence of EMT on the expression or nuclear localization of STAT1 or IRF1, 3 in A549 exposed to TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 (data not shown). It was previously reported that IKK $\epsilon$  phosphorylates the COOH terminal domain of IRF1 (Sgarbanti et al., 2014). IRF1 phosphorylation was shown to prevent its interactions with the RelA subunit of NF- $\kappa$ B. In our study, EMT of A549 mediated by cytokines did not increase the levels and nuclear localization of IRF1 following TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 exposition.

ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are other signaling pathways, which were demonstrated as involved in PD-L1 regulation in DC. In multiple myeloma, blocking ERK1/2 but not p38 MAP-kinases, PI3K nor NF- $\kappa$ B influenced PD-L1 regulation (Liu et al., 2007b). In addition, while IFN- $\gamma$  upregulates both PD-L1 and MHC class I on tumor cells, ERK1/2 inhibitors increase tumor-specific cytotoxic lymphocyte activity through MHC class I modulation without affecting PD-L1 expression (Mimura et al., 2014). In A549, ERK1/2 inhibition did not affect TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 driven EMT and PD-L1 expression (data not shown).

Mesenchymal cells are endowed with properties of proliferation and invasion, but are also able to resist to extrinsic apoptosis triggered by DR4, DR5 and Fas activation. Few studies (Knutson et al., 2006 ; Kudo-Saito et al., 2009 ; Santisteban CR 2009 ; Reiman -review- JM et al 2010 ) have already suggested that EMT foster cancer progression also by acting on immunosuppression and immunoresistance mechanisms allowing tumors to escape immune surveillance. A previous work has demonstrated that EMT is involved in the induction of immunosuppression (Kuto-Saido Can Cell 2009): mesenchymal cells are able to induce regulatory T cells and to impair dendritic cells in vitro and in vivo partly through TSP1 production. Inversely, elements of the immune system can act as inducers of EMT (Santisteban Can Res 2009): CD8 T cells can stimulate mammary epithelial tumor cells to undergo EMT. In the present study, we established another link between EMT and immune escape through the ability to evade immune functions by PD-L1 expression on tumour cells. The regulation of PD-L1 on cancer cells might depend on inflammatory stimuli since cytokine-mediated EMT but not Snail-mediated EMT promoted PD-L1 expression. In this process, IKK $\epsilon$  sustains the crucial role of inflammation during EMT to control PD-L1.

## Methods

**Cell culture:** The lung cancer cell line A549 was obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC) and was cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza, Paris, France) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cell culture was incubated in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Identification of A549 after transfections is controlled by analyzing the short tandem repeats following to recommendations of ATCC.

**Cell treatments:** The cytokines TNF-α and TGF-β were purchased from Peprotech (Neuilly-sur-Seine, France) and were used at the concentration of 20ng/ml and 4ng/ml, respectively. JSH-23 (catalog #481408) was obtained from Calbiochem (Lezennes, France) and was used at 25μM. The IKKε inhibitors Bx795 (catalog #702675-74-9) and MRT67307 (catalog #1190378-57-4) were used at 1 μM, which was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

**Plasmides:** A549 cells were transfected by plasmids encoding Snail-pBabe puro (plasmid 23347, Addgene, Cambridge, USA), NF-κB2-p52-cFlag-pcDNA3 (plasmid 20019, Addgene, Cambridge, USA), pBabe-Puro-Flag-IKBKE (plasmid 15292, Addgene , Cambridge, USA), psiRNA-h7SKGFPzeo (plasmid ksirn4-gz21, Invivogen, San Diego, USA), pcDNA3-IKKE-K38A-flag (plasmid 26202, Addgene, Cambridge, USA) and Ecadherin-pcDNA3.1-GFP (plasmid 28009, Addgene, Cambridge, USA) to obtain stable A549<sup>Snail-pBabe</sup>, A549<sup>NF-κBp52-pcDNA3</sup>, A549<sup>IKKE-pBabe</sup>, A549<sup>siIKKE-h7SK</sup>, A549<sup>K38A-pcDNA3</sup>, A549<sup>Ecadherin-pcDNA3.1</sup> cells, respectively. In parallel, transfections with the empty vectors were realized as a control. All transfections were performed using the Lipofectamine® 3000 Reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France) following the manufacturer's instructions and four days after transfection the cells undergo selection by geneticin at 1mg/mL (# 10131-027, Life Technologies, New York, USA), by puromycin (#ant-pr-1, Invivogen, San Diego, USA) at 2μg/ml or by Zeocine (#P/N46-0509, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) at 500μg/ml according to vector.

**Flow Cytometer:** For membrane staining, cells were incubated with corresponding antibody for 30 min at 4°C then washed with PBS (phosphate buffered saline) and centrifuged for 10 minutes at 300 G. Ten thousand cells from each sample were evaluated for fluorescence detection using BD FACSCanto cytometer. (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and analysed in FACS Diva software. The overlay graphs are made with the Flow Jo software.

Antibody used for Flow Cytometer: EpCAM, PD-L1, PD-L2 was obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), DR4, DR5, MICB, TRAIL, Fas from Dicalone (Gen-Probe, Besançon, France), Fas-L, Galectin-9 from Biolegend (San Diego, USA), MICA, ULBP1, ULBP3 from RD Systems (Lille, France), HLAG from eBiosciences, (Paris, France) and CD66 was produced in our laboratory.

**Western Blot:** Cellular proteins were separated by electrophoresis (SDS-PAGE) in a polyacrylamide gel in presence of sodium dodecylsulfate (SDS) according to their molecular weight, then transferred to a polyvinylidene difluoride film (PVDF) for staining by specific antibody and then detection by secondary antibody coupled to peroxidase.

Antibody used for Western Blot: E-Cadhéline, Vimentine, Snail, Slug, Zeb1, Gli1, Gli2, RelA , RelB, c-Rel, NF-κB1, NF-κB2, p100/p52, IKK $\epsilon$  was obtained from Cell Signaling (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France), Zeb2 (SIP1) from Clinisciences (Nanterre, France), Beta-actine, Alpha-tubuline from Sigma Aldrich ( Saint Quentin, France), Lamin B1 from Abcam (Cambridge, United Kingdom).

**Confocal Microscopy:** Cells were cultured in Labtek chamber slides (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with 0.1% Triton X100. After wash, cells were stained with appropriate antibodies. Cell nuclei were counterstained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole). Stacks of confocal images were collected with an Olympus FV1000 laser scanning confocal microscope.

Antibody used for Confocal Microscopy: Beta Catenin, E-cadherin was obtained from Clinisciences ( Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France).

**qRT-PCR :** Total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription were performed using M-MLV (Sigma-Aldrich, M-1302 according to manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). Quantitative PCR (qPCR) were done in duplicate

using the StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems), Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4367659), according to manufacturer's instructions. Expression level was normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

**Invasion test:** Cell invasion assay was performed using cell culture inserts with 8 µm pore size coated with Matrigel. A549 cells (180.000 cells/well) resuspended with 100µl DMEM were seeded in the upper side of the chamber. In the lower side of the chamber, 500µl DMEM was added. TGF-β and/or TNF-α were added into both sides of the chamber. After 24 h, cells on the lower surface of the chamber were trypsinized, resuspended in DMEM and counted with a trypan blue. The experiments were performed with duplicate, and repeated 3 times.

**ELISA assay:** Cells were cultured in 25 cm<sup>2</sup> dishes and treated with TNF-α, TGF-β or combination of these two cytokines. IFNy production was measured by using IFNy ELISA kit (Diacclone, France) with 100 µl of supernatant of treated cells in according to manufacturer's instructions.

## Conflict of interest

## Acknowledgments

## References

1. Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2455–2465.
2. Chen, C., Mu, C., Qu, Q., Zhu, Y., Sun, J., Zhang, X., and Huang, J. (2009). [The Expression and Biological Significance of PD-L1 on Lung Cancer Cell Lines.]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi Chin. J. Lung Cancer* *12*, 859–863.
3. Chen, Y., Mu, C.-Y., and Huang, J.-A. (2012). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori* *98*, 751–755.
4. Cheng, Z.-X., Sun, B., Wang, S.-J., Gao, Y., Zhang, Y.-M., Zhou, H.-X., Jia, G., Wang, Y.-W., Kong, R., Pan, S.-H., et al. (2011). Nuclear Factor-κB-Dependent Epithelial to Mesenchymal Transition Induced by HIF-1 $\alpha$  Activation in Pancreatic Cancer Cells under Hypoxic Conditions. *PLoS ONE* *6*, e23752.
5. Deng, W., Gowen, B.G., Zhang, L., Wang, L., Lau, S., Iannello, A., Xu, J., Rovis, T.L., Xiong, N., and Raulet, D.H. (2015). Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science* *348*, 136–139.
6. Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N., and Raulet, D.H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat. Immunol.* *1*, 119–126.
7. Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* *413*, 165–171.
8. Diefenbach, A., Hsia, J.K., Hsiung, M.-Y.B., and Raulet, D.H. (2003). A novel ligand

- for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* *33*, 381–391.
9. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* *5*, 1365–1369.
  10. Drake, C.G., Lipson, E.J., and Brahmer, J.R. (2014). Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *11*, 24–37.
  11. Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* *4*, 491–496.
  12. Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* *192*, 1027–1034.
  13. Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* *14*, 1014–1022.
  14. Gao, D., Vahdat, L.T., Wong, S., Chang, J.C., and Mittal, V. (2012). Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. *Cancer Res.* *72*, 4883–4889.
  15. Garg, M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J. Stem Cells* *5*, 188–195.
  16. Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* *419*, 734–738.
  17. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation.

*Cell* **144**, 646–674.

18. Heldin, C.-H., Vanlandewijck, M., and Moustakas, A. (2012). Regulation of EMT by TGF $\beta$  in cancer. *FEBS Lett.* **586**, 1959–1970.
19. Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* **199**, 1641–1650.
20. Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* **114**, 569–581.
21. Hutt, J.E., Shen, R.R., Abbott, D.W., Zhou, A.Y., Sprott, K.M., Asara, J.M., Hahn, W.C., and Cantley, L.C. (2009). Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation. *Mol. Cell* **34**, 461–472.
22. Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428.
23. Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431–436.
24. Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T., and Zhang, Z. (2005). TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir. Res.* **6**, 56.
25. Kawata, M., Koinuma, D., Ogami, T., Umezawa, K., Iwata, C., Watabe, T., and Miyazono, K. (2012). TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived

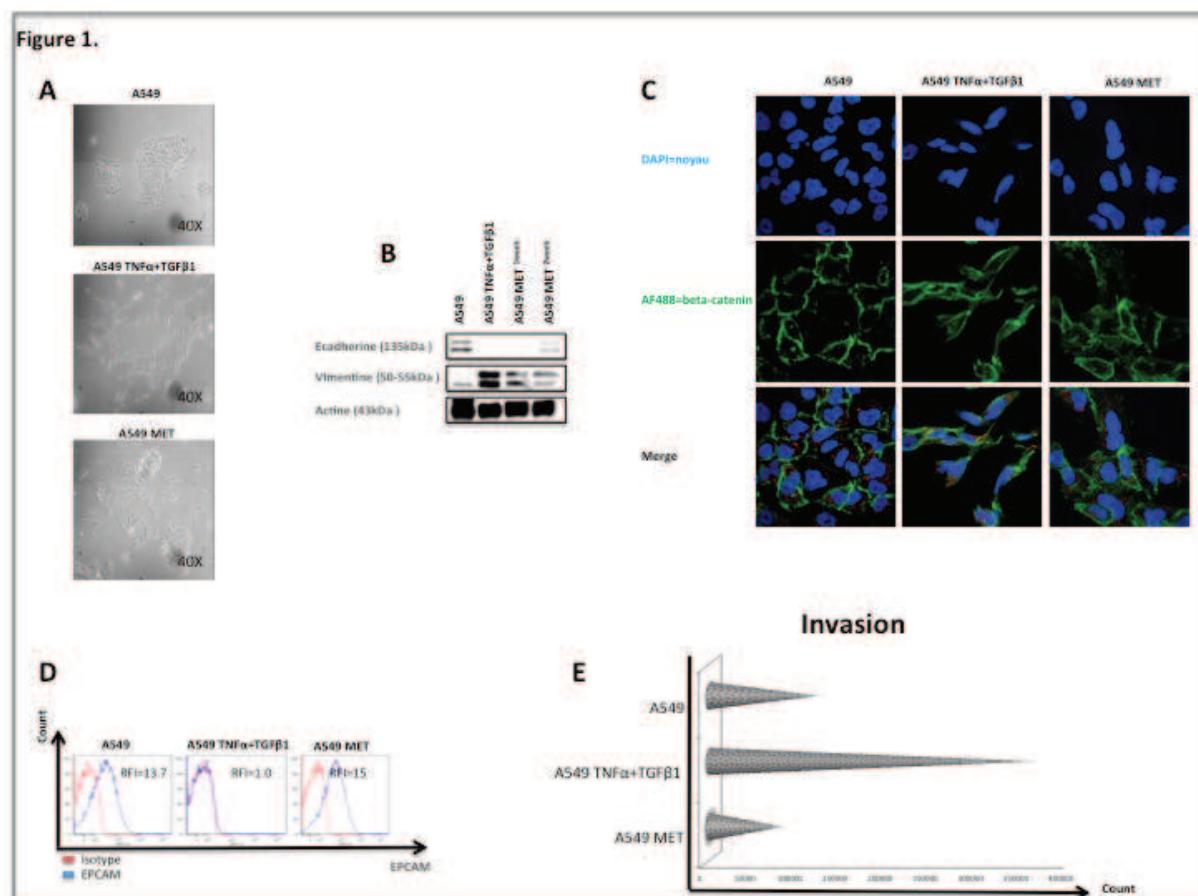
- from RAW 264.7 macrophage cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **151**, 205–216.
26. Korkaya, H., Liu, S., and Wicha, M.S. (2011). Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J. Clin. Invest.* **121**, 3804–3809.
27. Kumar, A., Negi, G., and Sharma, S.S. (2011). JSH-23 targets nuclear factor-kappa B and reverses various deficits in experimental diabetic neuropathy: effect on neuroinflammation and antioxidant defence. *Diabetes Obes. Metab.* **13**, 750–758.
28. Kumar, M., Allison, D.F., Baranova, N.N., Wamsley, J.J., Katz, A.J., Bekiranov, S., Jones, D.R., and Mayo, M.W. (2013). NF-κB regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells. *PLoS One* **8**, e68597.
29. Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 261–268.
30. Lee, S.-J., Jang, B.-C., Lee, S.-W., Yang, Y.-I., Suh, S.-I., Park, Y.-M., Oh, S., Shin, J.-G., Yao, S., Chen, L., et al. (2006). Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-γ-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett.* **580**, 755–762.
31. Li, C.-W., Xia, W., Huo, L., Lim, S.-O., Wu, Y., Hsu, J.L., Chao, C.-H., Yamaguchi, H., Yang, N.-K., Ding, Q., et al. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-α requires NF-κB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.* **72**, 1290–1300.
32. Liu, X. (2008). Inflammatory cytokines augments TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating TbetaR-I. *Cell Motil. Cytoskeleton* **65**, 935–944.
33. Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczkowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A., and Quesnel, B. (2007). Plasma cells from multiple myeloma

- patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-{gamma} and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* *110*, 296–304.
34. Loke, P., and Allison, J.P. (2003). PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5336–5341.
35. López-Novoa, J.M., and Nieto, M.A. (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol. Med.* *1*, 303–314.
36. Martínez, V.G., Hidalgo, L., Valencia, J., Hernández-López, C., Entrena, A., del Amo, B.G., Zapata, A.G., Vicente, A., Sacedón, R., and Varas, A. (2014). Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1031–1038.
37. Mimura, K., Kua, L.-F., Shiraishi, K., Kee Siang, L., Shabbir, A., Komachi, M., Suzuki, Y., Nakano, T., Yong, W.-P., So, J., et al. (2014). Inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway can induce upregulation of human leukocyte antigen class I without PD-L1-upregulation in contrast to interferon- $\gamma$  treatment. *Cancer Sci.* *105*, 1236–1244.
38. Ng, S.-L., Friedman, B.A., Schmid, S., Gertz, J., Myers, R.M., Tenoever, B.R., and Maniatis, T. (2011). I $\kappa$ B kinase epsilon (IKK(epsilon)) regulates the balance between type I and type II interferon responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 21170–21175.
39. Nguyen, L.T., and Ohashi, P.S. (2015). Clinical blockade of PD1 and LAG3-- potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 45–56.
40. 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-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.* *211*, 781–

41. Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.
42. Radisky, D.C., and Bissell, M.J. (2007). NF-κB links oestrogen receptor signalling and EMT. *Nat. Cell Biol.* *9*, 361–363.
43. Saito, A., Suzuki, H.I., Horie, M., Ohshima, M., Morishita, Y., Abiko, Y., and Nagase, T. (2013). An integrated expression profiling reveals target genes of TGF-β and TNF-α possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *PloS One* *8*, e56587.
44. Scheel, C., and Weinberg, R.A. (2012). Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin. Cancer Biol.* *22*, 396–403.
45. Scheel, C., Eaton, E.N., Li, S.H.-J., Chaffer, C.L., Reinhardt, F., Kah, K.-J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A.L., et al. (2011). Paracrine and Autocrine Signals Induce and Maintain Mesenchymal and Stem Cell States in the Breast. *Cell* *145*, 926–940.
46. Sgarbanti, M., Marsili, G., Remoli, A.L., Stellacci, E., Mai, A., Rotili, D., Perrotti, E., Acciioni, C., Orsatti, R., Iraci, N., et al. (2014). IκB kinase ε targets interferon regulatory factor 1 in activated T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 1054–1065.
47. Shen, R.R., and Hahn, W.C. (2011). Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene* *30*, 631–641.
48. Shi, M., Xing, Y., Zhang, Z., Huang, J., and Chen, Y. (2013). [Effect of soluble PD-L1 released by lung cancer cells in regulating the function of T lymphocytes]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* *35*, 85–88.
49. Shin, H.-M., Kim, M.-H., Kim, B.H., Jung, S.-H., Kim, Y.S., Park, H.J., Hong, J.T., Min, K.R., and Kim, Y. (2004). Inhibitory action of novel aromatic diamine compound

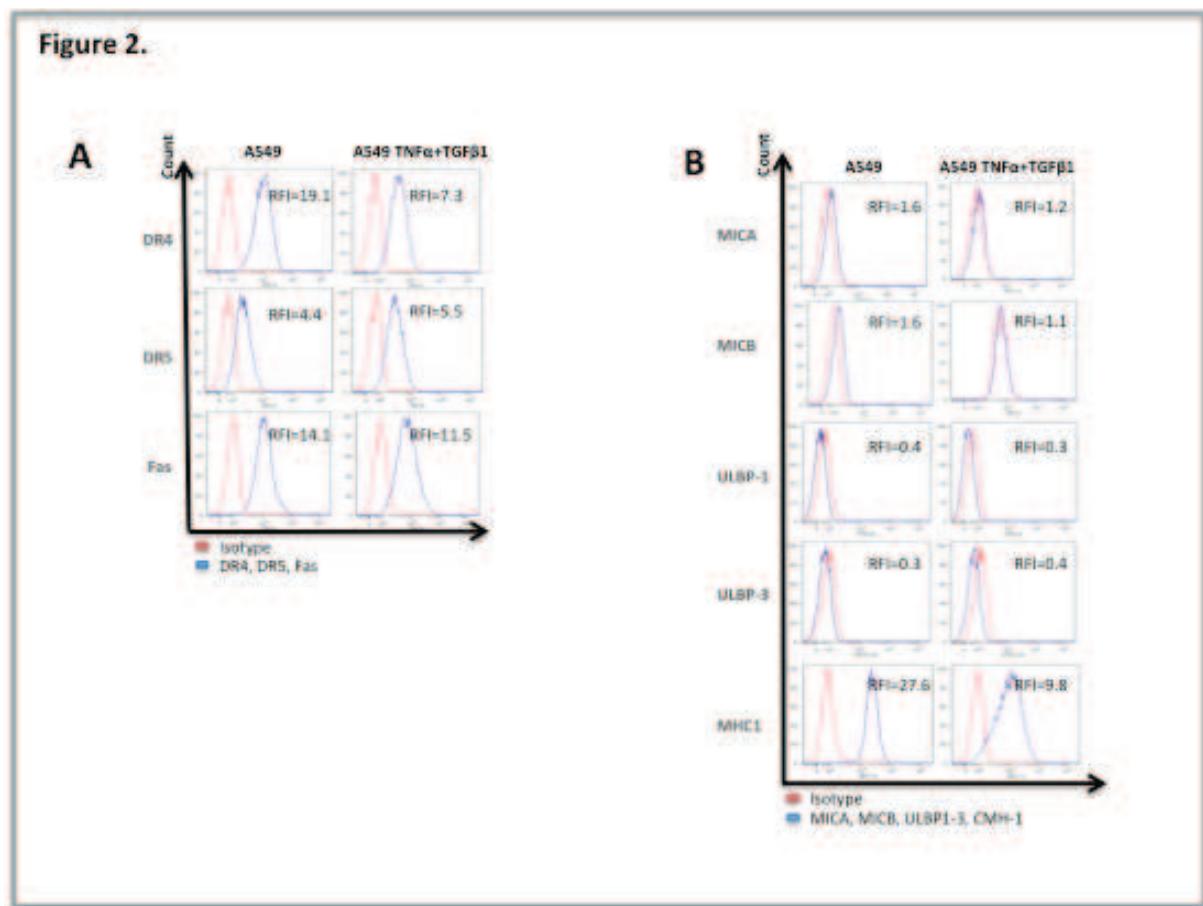
- on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation. *FEBS Lett.* **571**, 50–54.
50. Tenover, B.R., Ng, S.-L., Chua, M.A., McWhirter, S.M., García-Sastre, A., and Maniatis, T. (2007). Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science* **315**, 1274–1278.
51. Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131–142.
52. Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890.
53. Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454.
54. Tseng, S.Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J.E., Pai, S.I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D.M., and Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* **193**, 839–846.
55. Xu, J., Lamouille, S., and Deryck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156–172.
56. Yamauchi, Y., Kohyama, T., Takizawa, H., Kamitani, S., Desaki, M., Takami, K., Kawasaki, S., Kato, J., and Nagase, T. (2010). Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1. *Exp. Lung Res.* **36**, 12–24.

**Figure 1.**



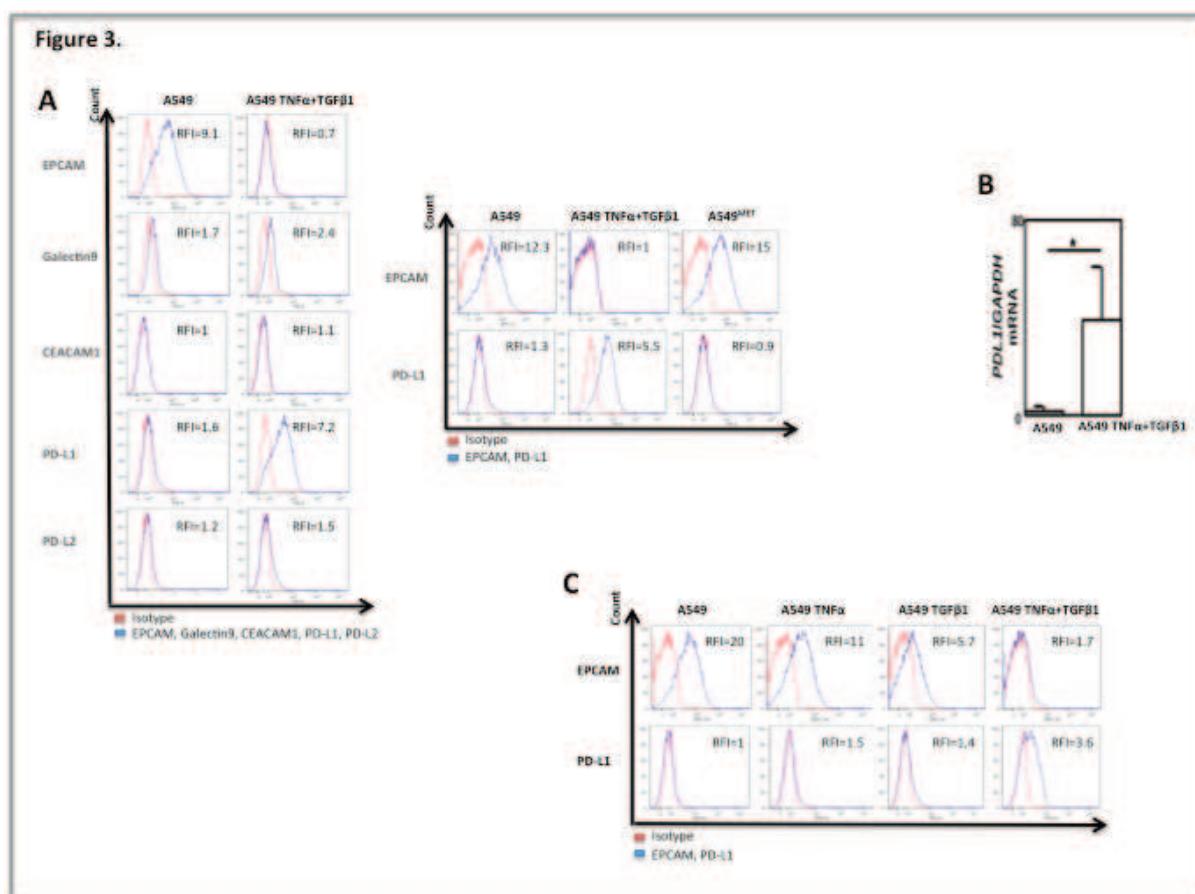
**Figure 1 / Validation of EMT model.** (A) After 5 days of treatment with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1, the epithelial cell line A549 loses its cell polarity, cell-cell adhesion and acquire mesenchymal structure. But this EMT is not stable. After removing cytokines, these cells undergo MET and become epithelial. (B) Loss of epithelial marker E-cadherin, and acquisition of mesenchymal marker Vimentin in A549 after treatment with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in Western Blotting. After the removal of cytokines, in one week, expressions of E-cadherin and Vimentin return to their original state. (C) Image of nuclear translocation of  $\beta$ -catenin by confocal microscopy after treatment with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. Also extra-nuclear translocation of  $\beta$ -catenin is observed during MET. (D) Loss of EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) staining measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS) after treatment with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. The cancer cells undergoing MET after the removal of cytokines TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 also restore the expression of EPCAM. (E) The A549 undergoing EMT acquires more important invasive capacity, which return to initial state during MET.

**Figure 2.**

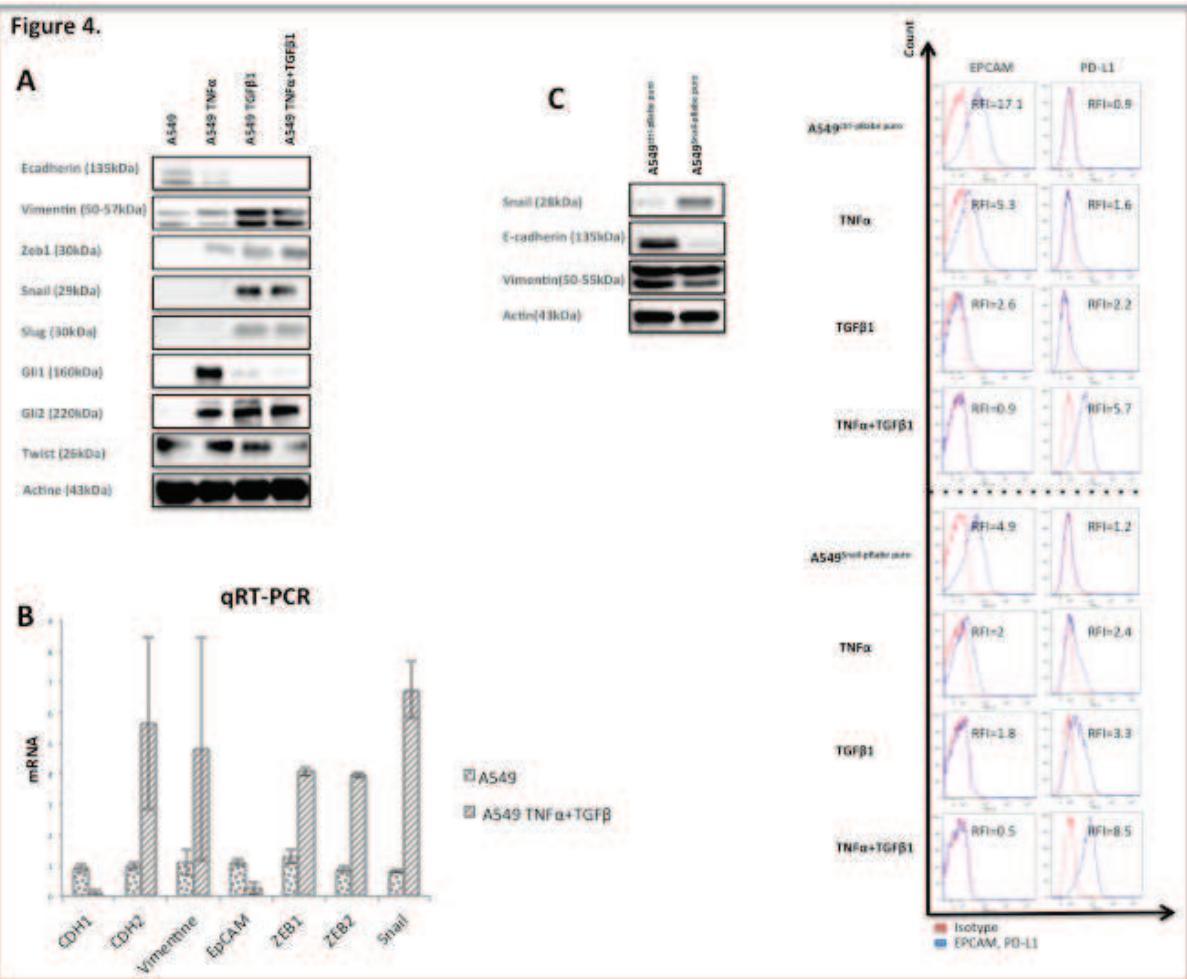


**Figure 2 / Regulation of death receptors and NK cell activation ligands during EMT.**  
(A) FACS analysis of variations of death receptors TRAILR1 (DR4), TRAILR2 (DR5) and CD95 (Fas) were not significant after treatment with TNF- $\alpha$ +TGF- $\beta$ 1 of A549 cells. (B) No changes observed in expression of different ligands induced by stress and implicated in the activation of NK cells, as MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-3, MHC-1 by FACS over A549 and A549<sup>EMT</sup>(undergoing EMT). Decrease of MHC-1 wasn't significant after treatment with the combination of TNF- $\alpha$ +TGF- $\beta$ 1.

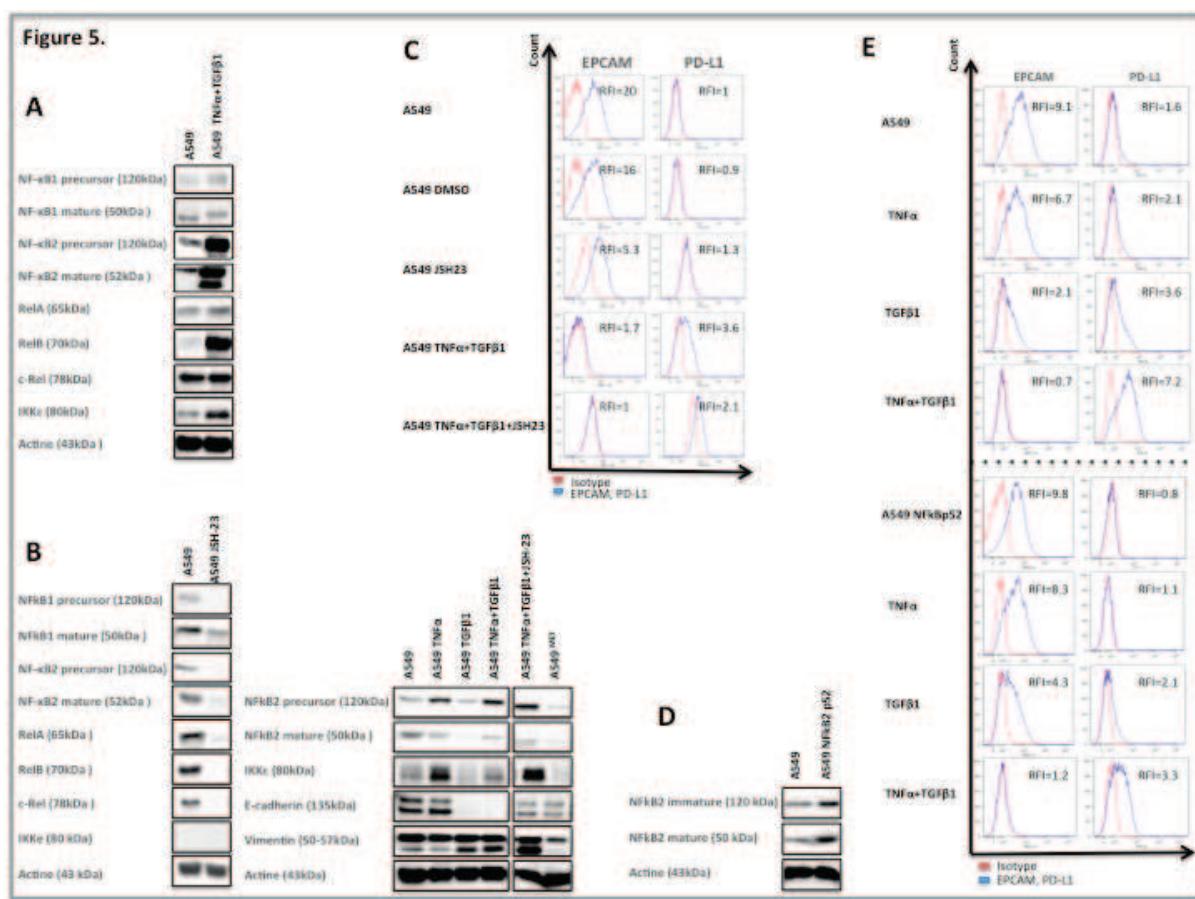
**Figure 3.**



**Figure 3 / TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 cooperate to promote PD-L1 expression during EMT.**  
(A) The expression of immune-checkpoint inhibitors as Galectin-9, CEACAM1, PD-L1, PD-L2 before and after induction of EMT on A549 cells. Only PD-L1 showed an increased expression after treatment with TNF- $\alpha$ +TGF- $\beta$ 1 and his expression return to initial state during MET. (B) Increase of PD-L1 in mRNA levels by qRT-PCR, (C) in membrane expression levels by FACS. Measurements were independently repeated at least three times.

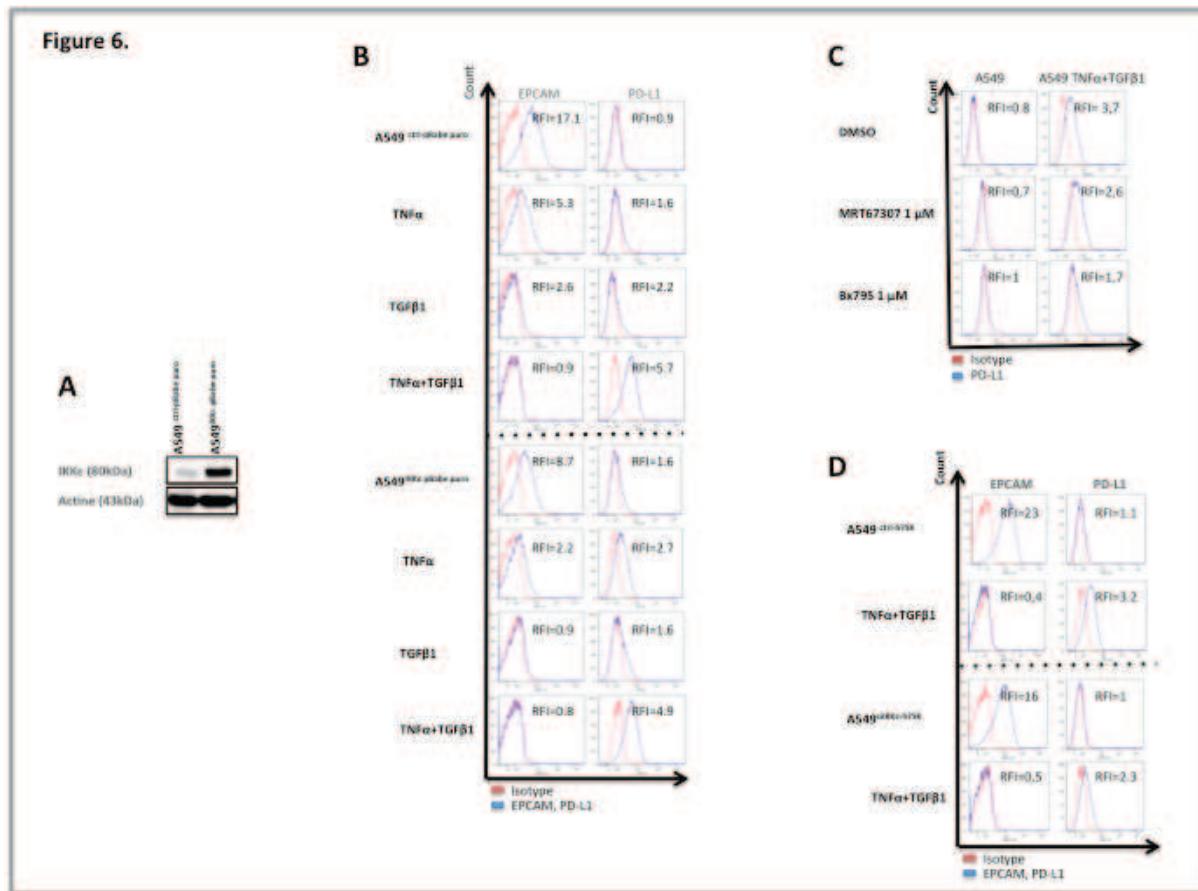
**Figure 4.**

**Figure 4/ PD-L1 expression is not regulated by conventional EMT transcriptional regulators in A549.** (A) Changes in protein levels of several transcription factors of EMT as Zeb1, Zeb2, Snail, Slug, Gli1, Gli2, Twist after treatment of A549 cells with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ , by Western Blot. This manipulation was realized three times and actin was used as a housekeeping gene. (B) qRT-PCR analysis shows increased expression of transcription factors of EMT in mRNA levels after treatment with TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  or both cytokines. GAPDH was used as a housekeeping gene. (C) In Western Blot the expression of Vimentin and E-cadherin were not changed after transfection with Snail. (D) PD-L1 expression during treatment with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in A549 cancer cells transfected with Snail or control vector.

**Figure 5.**

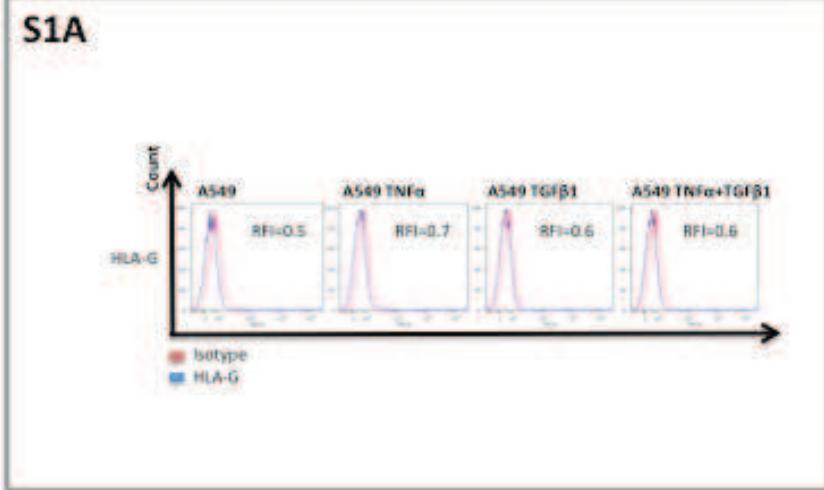
**Figure 5/ PD-L1 regulations during EMT is p52 independent on A549.** (A) Changes on expressions of different subunits of NF- $\kappa$ B by Western Blotting: RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 revealed increase of NF- $\kappa$ B2 in EMT model, established by treatment with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . These cells also show increased IKK $\epsilon$  expression (B) Treatment with JSH-23 (inhibitor of NF- $\kappa$ B) decreases the expression of different subunits of NF- $\kappa$ B in protein levels. (C) Combination of JSH-23 with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  doesn't impact the expression of EPCAM or PD-L1 during EMT. (D) Transfection efficiency of A549 with NF- $\kappa$ Bp52 by Western Blot. (E) NF- $\kappa$ B2 transfection doesn't impact PD-L1 expression with or without TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  on A549 cells.

**Figure 6.**



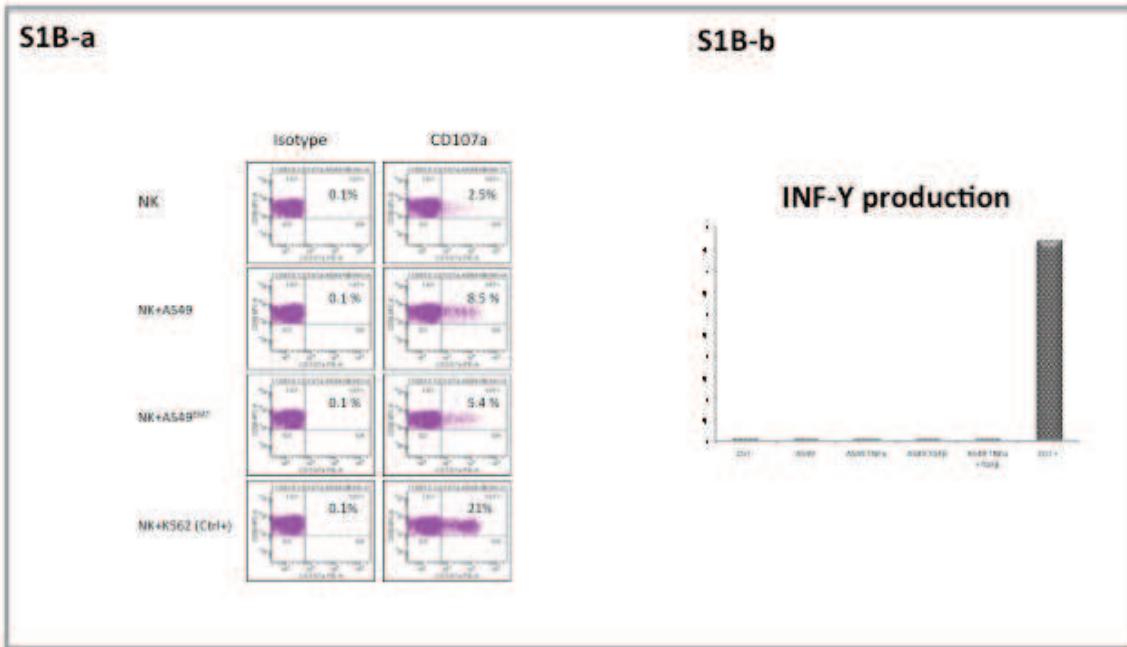
**Figure 6/ Role of IKK $\epsilon$  in the regulation of PD-L1 by EMT in A549.** (A) A549 cells were transfected with plasmid expressing IKK $\epsilon$ . After transfection the expression of IKK $\epsilon$  was measured by WB at protein level. (B) FACS carried on A549IKK $\epsilon$  cells after treatment with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  for the expression of PD-L1 and EPCAM. (C) PD-L1 and EPCAM expression in A549 cells treated with TNF- $\alpha$ +TGF- $\beta$  and with Bx795 or MRT67307 (inhibitors of IKK $\epsilon$ ). (D) PD-L1 expression in A549 cells transfected with siRNA IKK $\epsilon$  treated with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ .

**Supplementary data**



**S1A. HLAG expression in A549 cells treated with TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta$  or both.**

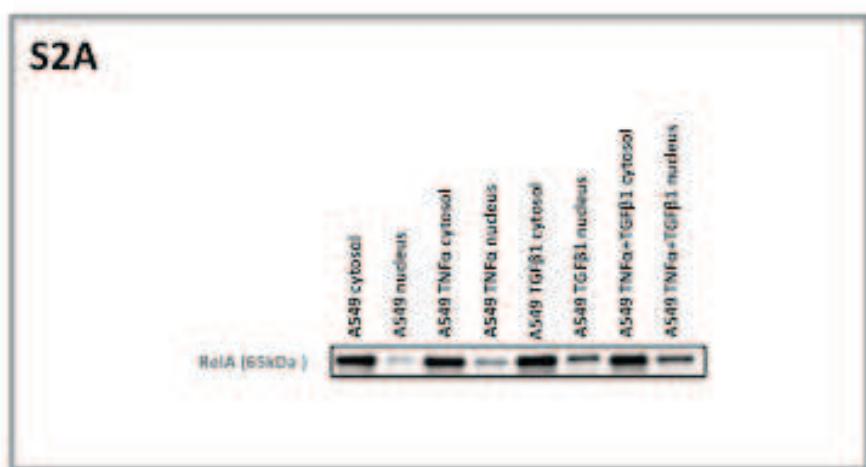
**Supplementary data**



**S1B. (a) CD107A staining in NK cells after 24h co-culture with A549 cells.**

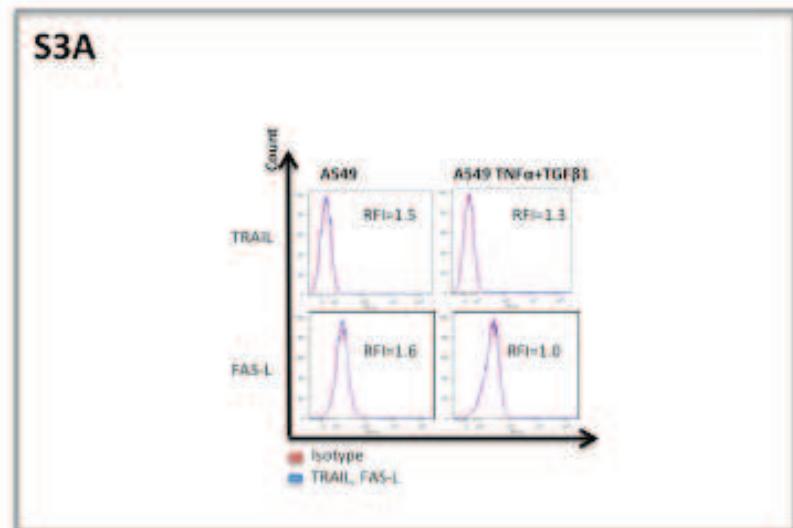
**(b) IFNy measurement by ELISA assay.**

**Supplementary data**



**S2A. Nuclear expression of RelA by Western blotting.**

**Supplementary data**



**S3A. TRAIL and Fas-L staining.**

# DISCUSSION



La dissémination métastatique est une étonnante aventure cellulaire, au cours de laquelle les cellules cancéreuses subissent premièrement la TEM pour pouvoir rentrer dans le système sanguin et se propager. Ensuite, elles subissent la MET pour revenir dans leur état basal, ce qui leur permettra de former des colonies sur les sites envahis (Tam and Weinberg, 2013) Mais pour pouvoir former des métastases, les cellules cancéreuses ont besoin en premier lieu d'échapper au système immunitaire pour éviter la mort. Pendant nos travaux, nous avons essayé de découvrir l'influence de la TEM sur PD-L1, qui sert aux cellules tumorales comme un outil d'échappement au SI.

Pour étudier le rôle de la TEM dans l'échappement tumoral, nous avons décidé d'utiliser un modèle réversible de la TEM. L'induction de la TEM sur la lignée A549 avec des cytokines a déjà été décrit et utilisé comme modèle par plusieurs équipes (Kasai et al., 2005), (Liu, 2008), (Yamauchi et al., 2010), (Kawata et al., 2012), (Saito et al., 2013). Le traitement avec la cytokine TGF- $\beta$ 1 induit la réduction de l'E-cadhérine, mais ne change pas l'aspect morphologique des cellules, par contre la stimulation avec la cytokine TNF- $\alpha$  induit l'apparence fibroblastique, montrant une faible immunoréactivité pour E-cadhérine (Yamauchi et al., 2010). A cet effet, dans notre étude la lignée cellulaire A549 a été exposée au traitement avec la combinaison des cytokines TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$ 1 pendant 5 jours. Cette combinaison a permis de convertir les cellules épithéliales A549 en cellules mésenchymateuses. De plus, l'élimination de ces cytokines, conduit à la restauration d'un phénotype épithelial dans les 5 jours suivants. Ce modèle inductible de TEM et de MET in vitro, nous a permis de mettre en évidence les changements spécifiques à la TEM et de comparer la reconnaissance des cellules épithéliales et mésenchymateuses par les effecteurs du SI.

Les cellules du système immunitaire innées comme les NK et les cellules du système immunitaire adaptatif comme les CTL peuvent avoir la capacité de reconnaître, infiltrer et éliminer les cellules cancéreuses. Mais pour résister à cette destruction par le SI, les cellules tumorales déploient de multiples mécanismes. Elles perdent l'expression des ULBPs, de MICA/MICB, qui sont les ligands pour des récepteurs activateurs des cellules NK. Elles libèrent des cytokines inhibitrices comme le TGF- $\beta$ , et expriment des molécules inhibitrices comme PD-L1, Galectine-9. Les cellules tumorales peuvent aussi prévenir l'activation des

cellules du SI par diminution de l'expression du CMH-I, qui assure la présentation de l'antigène au cellules du SI (Nagata, 1996)(Schimmer, 2004) (Domagala-Kulawik et al., 2014). Mais les cellules tumorales peuvent aussi sécréter les ligands des récepteurs de mort, qui vont se lier à leurs récepteurs sur les CTL et les NK et induire la mort de ces cellules. Pendant nos travaux de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'induction de PD-L1.

Comme décrit dans l'introduction, les facteurs de transcription comme Zeb, Snail, Slug, Twist, Gli1, Gli2 jouent un rôle majeur dans l'induction de la TEM et ses facteurs peuvent être induits par les cytokines comme TNF- $\alpha$  ou TGF- $\beta$ , produits par les cellules stromales ou par les cellules tumorales (Thiery and Sleeman, 2006). Lors de nos travaux tout premièrement, nous nous sommes interrogés sur l'augmentation de PD-L1 dans notre modèle de TEM induit par les cytokines TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$  ; afin de savoir si cela peut être liée aux FA-TEM ; mais cette piste a très vite été exclue. En effet, l'augmentation de PD-L1 a été observée seulement lors du traitement avec la combinaison de TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$  aboutissant à la TEM, par contre pour induire l'expression des divers FA-TEM le traitement avec TGF- $\beta$  seul a été suffisant. Les FA-TEM sont déjà décrits pour leur capacité à se fixer sur l'E-box du promoteur de l'E-cadhéline et à bloquer son expression. Ainsi, la transfection avec ses FA-TEM aboutit à la diminution d'E-cadhéline. Malgré tout, la transfection avec les FA-TEM n'a pas été suffisante pour induire une TEM complète, et il n'y a pas eu d'augmentation de PD-L1 lors de la transfection. Cette observation montre que l'induction de PD-L1 n'était pas générée par les FA-TEM.

Dans un deuxième temps, nous avons testé la voie NF- $\kappa$ B connue comme une voie de signalisation jouant un rôle majeur dans l'induction de la prolifération des cellules cancéreuses, ainsi décrit pour sa capacité de se fixer sur le promoteur de PD-L1 et induire son expression. L'induction d'une TEM par le traitement TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$ , change l'expression de la sous-unité NF- $\kappa$ B2 et d'IKK $\epsilon$  connu comme un oncogènes dans un large spectre de cancer. Mais le traitement avec TNF- $\alpha$  seul est aussi suffisant pour induire l'expression d'IKK $\epsilon$  et de NF- $\kappa$ B2. La transfection avec la sous-unité NF- $\kappa$ B2 a montré encore une fois que l'induction de PD - L1 n'était pas liée d'une manière directe à l'expression de NF- $\kappa$ B. Comme nous avons observé l'induction d'IKK $\epsilon$  lors du traitement, cette piste aussi a été explorée.

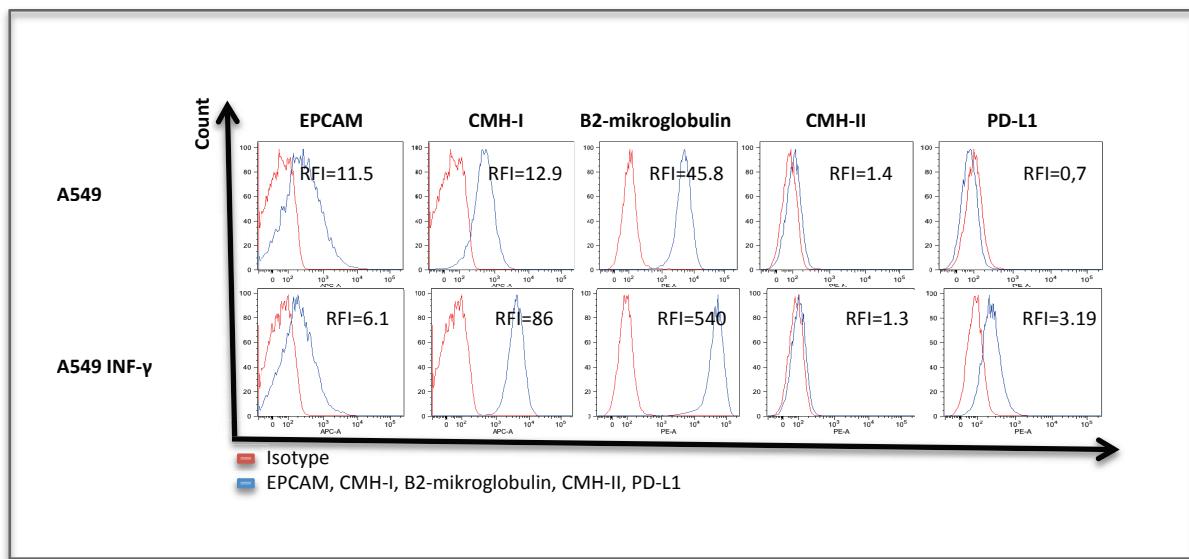
Lors de la transfection avec IKK $\epsilon$ , le traitement avec TNF- $\alpha$  seul est suffisant pour induire PD-L1 ; et de la même manière lors de la transfection avec siIKK $\epsilon$ , l'augmentation de l'expression de PD-L1 lors du traitement avec TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$  est moins importante. Tout cela montre l'implication d'IKK $\epsilon$  dans l'augmentation de PD-L1.

Avant d'être écrit comme un oncogène, IKK $\epsilon$  est connu surtout pour son effet régulateur dans l'activité transcriptionnelle de STAT1, STAT3, IRF3, IRF7, en plus de celle de NF- $\kappa$ B. Lors de l'induction de la TEM avec les cytokines TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$ , il y a l'augmentation de l'expression d'IRF1 et d'IRF7, mais aucune augmentation de STAT1, ni de STAT3 et de IRF3. Il nous reste donc deux pistes à explorer pour savoir par quelle voie IKK $\epsilon$  peut induire l'expression de PD-L1.

Auparavant l'expression de PD-L1 était associée aux facteurs clinico-pathologiques dans divers types des cancers et dans notre étude nous l'avons montré comme un nouveau mécanisme d'échappement induit par la TEM dans le cancer du poumon. Il y a actuellement en clinique des anticorps ciblant les diverses molécules de l'immune checkpoint et parmi les ligands de ces points de contrôle immunologique, PD-L1 est le plus étudié dans le cancer de poumon. La production d'anticorps antagonistes ciblant les cytokines (anti- TNF- $\alpha$ , anti- TGF- $\beta$ , anti-IL-10) et d'anticorps bloquant les voies inhibitrices ( anti CTLA-4, anti PD-L1) est actuellement parmi les stratégies connues pour réactiver le système immunitaire (Dougan and Dranoff, 2009), (Mellman et al., 2011), (Scott et al., 2012), (Ileana et al., 2013).

#### **L'IFN- $\gamma$ induit l'expression de PD-L1 :**

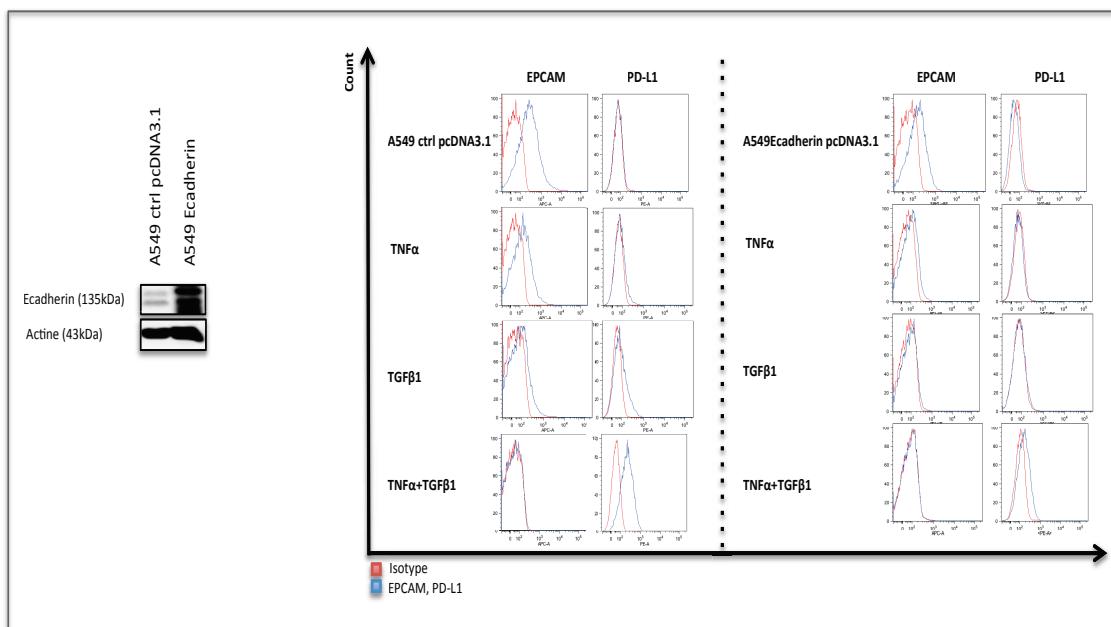
L'IFN- $\gamma$  est connu pour sa capacité à promouvoir l'activité des cellules NK et la présentation de l'Ag via l'induction du CMH. Mais l'IFN-  $\gamma$ , produit et sécrété par les cellules inflammatoires dans le micro-environnement tumoral, est le principal inducteur de l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales (Iwai et al., 2002)(Mühlbauer et al., 2006), (Cheng et al., 2007b) (Chen et al., 2012b). L'induction de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses par l'IFN-  $\gamma$  est un effet commun. Pourtant, ceci est contraire aux activités anti-cancéreuses de l'IFN-  $\gamma$  comme inhibiteur de la prolifération des cellules cancéreuses et de l'invasion (Nicolini et al., 2006). Le traitement de la lignée A549 avec cette cytokine aboutit effectivement à l'induction de PD-L1 et de CMH-I d'après nos résultats.



**Figure 28: L'INF- $\gamma$  induit l'expression de PD-L1.**

### Une forte expression d'E-cadhéchine empêche l'induction de PD-L1 :

La lignée A549 exprime à la base E-cadhérine de manière faible ; et l'augmentation forcée de l'expression d'E-cadhérine par transfection empêche l'induction de PD - L1 suite au traitement avec les cytokines TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$  dans cette lignée. La transfection avec le vecteur exprimant le gène codant pour E-cadhérine a montré encore une fois le lien entre la TEM et l'expression de PD-L1 dans la lignée A549. Ainsi que ce traitement n'est pas capable d'induire la TEM dans le cas des lignées avec une forte expression d'E-cadherin.

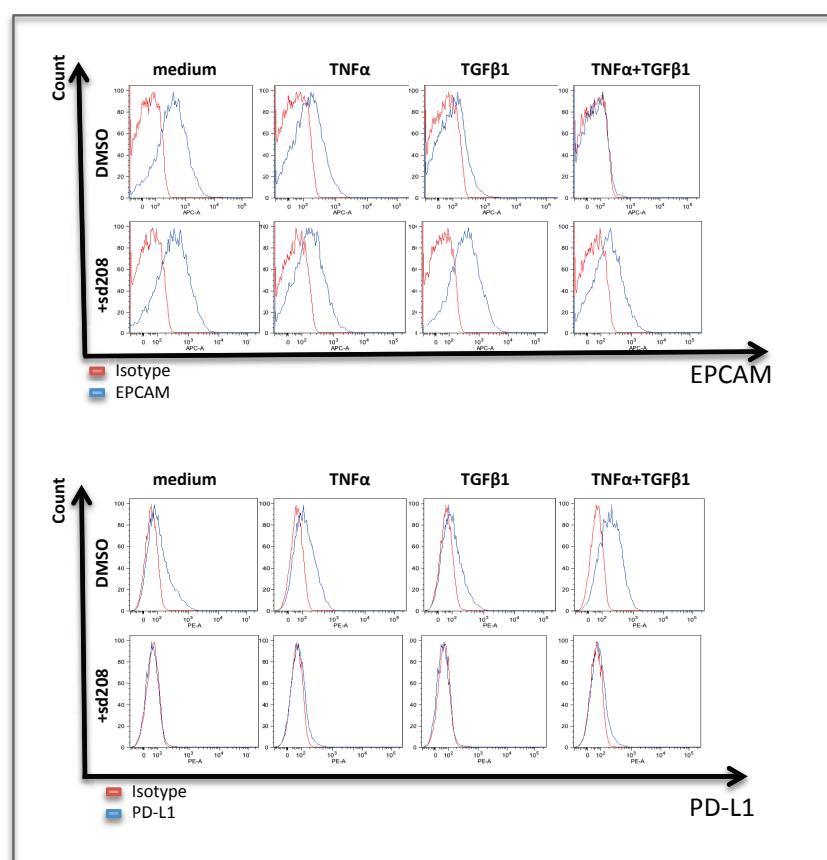


**Figure 29: E-cadhéchine empêche l'induction de PD-L1.**

### **Le TGF- $\beta$ est préliminaire dans la régulation de PD-L1 :**

Nous avons montré dans la partie résultats l'implication d'IKK $\epsilon$  dans la régulation de PD-L1. L'expression d'IKK $\epsilon$  a déjà été observée lors du traitement avec le TNF- $\alpha$  seul, pourtant celui-ci n'est pas suffisant pour induire l'expression de PD-L1. Mais lors du traitement de lignées transfectées avec IKK $\epsilon$ , le traitement avec le TNF- $\alpha$  seul est suffisant pour induire l'expression de PD-L1. Toutes ses observations peuvent emmener à une question : « Si l'expression d'IKK $\epsilon$  est induite avec le TNF- $\alpha$  et que c'est IKK $\epsilon$  qui induit l'expression de PD-L1 via IRF ; pourquoi avons nous besoin du TGF- $\beta$  ? »

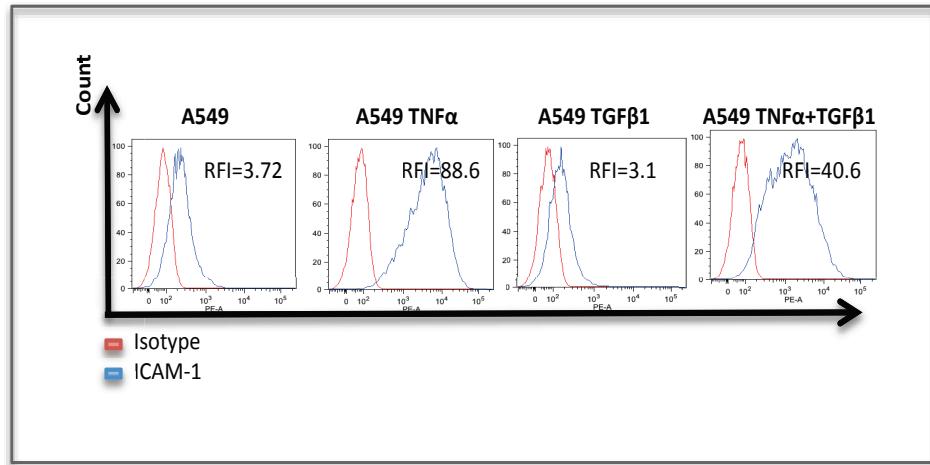
On suppose qu'il existe des signalisations croisées entre les différentes voies du TGF- $\beta$  et du TNF- $\alpha$ . Ainsi, lors du blocage de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ , il n'y a ni l'induction de la TEM, ni l'augmentation de PD-L1.



**Figure 30: Le TGF-  $\beta$  est préliminaire dans la régulation de PD-L1.**

### **L'augmentation de l'expression d'ICAM-1 avec le TNF- $\alpha$ .**

Lors du traitement de la lignée A549 avec le TNF- $\alpha$ , il y a l'augmentation de l'expression d'ICAM-1.



**Figure 31: L'augmentation de l'expression d'ICAM-1 avec le TNF-  $\alpha$ .**

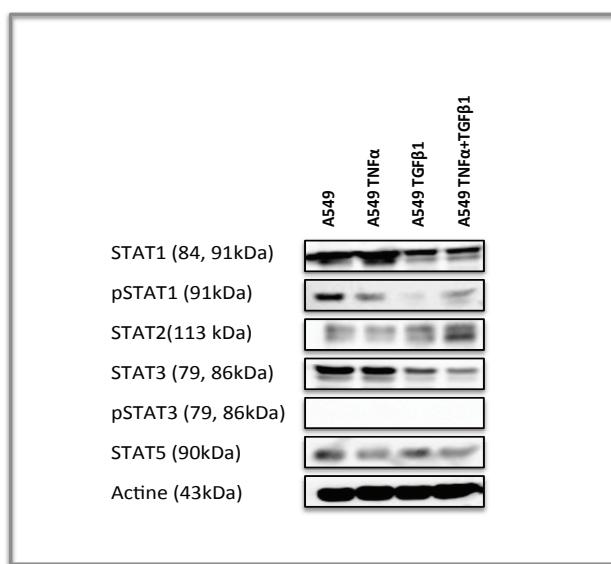
Dans le cas de diverses inflammations, on retrouve des niveaux élevés d'ICAM-1s (ICAM1 soluble) dans le sérum des patients, mais il est aussi décrit comme un facteur de mauvais pronostique dans le cas des cancers.

- L'expression d'ICAM-1 par la cellule tumorale conditionne leur potentiel métastatique (Roland et al., 2007).
- La sécrétion élevée d'ICAM-1s par les cellules cancéreuses bloque la reconnaissance par les LT (Tsakadze et al., 2004),(Grothey et al., 1998).

### **Les STATs:**

PD-L1 est surexprimé dans les cellules tumorales via l'activation des voies clés de l'oncogenèse. Comme nous l'avons indiqué auparavant le promoteur de PD-L1 a des sites de liaison pour IRF-1 et NF- $\kappa$ B. L'IFN- $\gamma$  par la voie de signalisation JAK / STAT-1 / IRF-1, les ligands de TLR par la voie de signalisation MEK / ERK / NF- $\kappa$ B augmentent la transcription du gène de PD-L1. Nous avons exploré l'implication de NF- $\kappa$ B et d'IRF-1 dans la régulation de PD-L1 pendant notre travail. Mais il y a aussi une étude montrant l'induction de PD-L1 par

STAT3 dans le cancer du poumon (Marzec et al., 2008) . En s'appuyant sur cette étude, nous avons testé l'expression des différentes STAT dans le but de voir les changements subi lors du traitement avec les cytokines TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ . Sachant qu'IKK $\epsilon$  est connu pour induire la phosphorylation de STAT1 et de STAT3, nous avons aussi testé leur forme phosphorylée après le traitement avec les cytokines TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ . STAT1, STAT3, ni leur forme phosphorylée n'a été augmenté lors du traitement avec TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$ . Par contre, il y avait une légère augmentation de STAT2.



**Figure 32: La TEM n'induit par l'expression des STATs.**

En conclusion, nos travaux montrent que le programme de la TEM utilisé lors de la phase d'invasion des cellules tumorales, induit l'expression de PD-L1. Nous avons observé que ce processus est spécifique car les autres voies de signalisation de l'échappement au système immunitaire explorées, ne sont pas modulées lors de la TEM induite par les cytokines dans A549. Enfin, nous avons mis en évidence le rôle de la protéine IKK $\epsilon$  dans ce modèle.



# BIBLIOGRAPHIE



1. Adamson, E.D. (1987). Oncogenes in. *Development* 99, 449–471.
2. Adli, M., and Baldwin, A.S. (2006). IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 26976–26984.
3. Afreen, S., and Dermime, S. (2014). The immunoinhibitory B7-H1 molecule as a potential target in cancer: killing many birds with one stone. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* 7, 1–17.
4. Ahmadzadeh, M., and Rosenberg, S.A. (2005). TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 5215–5223.
5. Aigner, K., Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., Mikulits, W., Brabletz, T., Strand, D., Obrist, P., et al. (2007). The transcription factor ZEB1 ( $\delta$ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 26, 6979–6988.
6. Alexander, N.R., Tran, N.L., Rekapally, H., Summers, C.E., Glackin, C., and Heimark, R.L. (2006). N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res.* 66, 3365–3369.
7. Allingham, M.J., van Buul, J.D., and Burridge, K. (2007). ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 4053–4064.
8. Anderson, A.C. (2014). Tim-3: An Emerging Target in the Cancer Immunotherapy Landscape. *Cancer Immunol. Res.* 2, 393–398.
9. Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.-P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al. (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 14, 79–89.
10. Ansieau, S., Morel, A.-P., Hinkal, G., Bastid, J., and Puisieux, A. (2010). TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene* 29, 3173–3184.
11. Araki, S., Eitel, J.A., Batuello, C.N., Bijangi-Vishehsaraei, K., Xie, X.-J., Danielpour, D., Pollok, K.E., Boothman, D.A., and Mayo, L.D. (2010). TGF-beta1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer. *J. Clin. Invest.* 120, 290–302.
12. Arrowsmith, C.H. (1999). Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ.* 6, 1169–1173.
13. Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K.F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J.L., Gallick, G.E., Logsdon, C.D., McConkey, D.J., and Choi, W. (2009). Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 69, 5820–5828.
14. Astle, M.V., Hannan, K.M., Ng, P.Y., Lee, R.S., George, A.J., Hsu, A.K., Haupt, Y., Hannan, R.D., and Pearson, R.B. (2012). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 31, 1949–1962.
15. Baldwin, A.S., Jr (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649–683.
16. Bao, B., Wang, Z., Ali, S., Kong, D., Li, Y., Ahmad, A., Banerjee, S., Azmi, A.S., Miele, L., and Sarkar, F.H. (2011). Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 307, 26–36.
17. Barach, Y.S., Lee, J.S., and Zang, X. (2011). T cell coinhibition in prostate cancer: new immune evasion pathways and emerging therapeutics. *Trends Mol. Med.* 17, 47–55.

18. Bates, R.C., and Mercurio, A.M. (2003). Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1790–1800.
19. Belkaid, Y., and Oldenhove, G. (2008). Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* **29**, 362–371.
20. Beltran, M., Puig, I., Peña, C., García, J.M., Alvarez, A.B., Peña, R., Bonilla, F., and de Herreros, A.G. (2008). A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev.* **22**, 756–769.
21. Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407–412.
22. Berthon, C., Driss, V., Liu, J., Kuranda, K., Leleu, X., Jouy, N., Hetuin, D., and Quesnel, B. (2010). In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors. *Cancer Immunol. Immunother.* **CII 59**, 1839–1849.
23. Bezdekova, M., Brychta, S., Sedlakova, E., Langova, K., Brychta, T., and Belej, K. (2012). Analysis of snail-1, e-cadherin and claudin-1 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 1632–1643.
24. Bierie, B., and Moses, H.L. (2006). TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 29–40.
25. Bierie, B., and Moses, H.L. (2010). Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 49–59.
26. Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta* **1198**, 11–26.
27. Blanco, M.J., Moreno-Bueno, G., Sarrio, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J., and Nieto, M.A. (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* **21**, 3241–3246.
28. Blechschmidt, K., Sassen, S., Schmalfeldt, B., Schuster, T., Höfler, H., and Becker, K.-F. (2008). The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients. *Br. J. Cancer* **98**, 489–495.
29. Boehm, J.S., Zhao, J.J., Yao, J., Kim, S.Y., Firestein, R., Dunn, I.F., Sjostrom, S.K., Garraway, L.A., Weremowicz, S., Richardson, A.L., et al. (2007). Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell* **129**, 1065–1079.
30. Bohuslav, J., Chen, L.-F., Kwon, H., Mu, Y., and Greene, W.C. (2004). p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 26115–26125.
31. Bollmann, F.M. (2013). Physiological and pathological significance of human telomerase reverse transcriptase splice variants. *Biochimie* **95**, 1965–1970.
32. Bowie, A.G., and Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 911–922.
33. Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474–2488.
34. Brabertz, T. (2012). To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 425–436.
35. Brabertz, S., and Brabertz, T. (2010). The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* **11**, 670–677.

36. Brabletz, S., Bajdak, K., Meidhof, S., Burk, U., Niedermann, G., Firat, E., Wellner, U., Dimmler, A., Faller, G., Schubert, J., et al. (2011). The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J.* **30**, 770–782.
37. Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10356–10361.
38. Bracken, C.P., Gregory, P.A., Kolesnikoff, N., Bert, A.G., Wang, J., Shannon, M.F., and Goodall, G.J. (2008). A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* **68**, 7846–7854.
39. Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2455–2465.
40. Bromberg, J., and Darnell, J.E., Jr (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**, 2468–2473.
41. Brown, J.A., Dorfman, D.M., Ma, F.-R., Sullivan, E.L., Munoz, O., Wood, C.R., Greenfield, E.A., and Freeman, G.J. (2003). Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 1257–1266.
42. Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., and Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* **9**, 582–589.
43. Byles, V., Zhu, L., Lovaas, J.D., Chmielewski, L.K., Wang, J., Faller, D.V., and Dai, Y. (2012). SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis. *Oncogene* **31**, 4619–4629.
44. Cagatay, T., and Ozturk, M. (2002). P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene* **21**, 7971–7980.
45. Cai, J., Kandagatla, P., Singareddy, R., Kropinski, A., Sheng, S., Cher, M.L., and Chinni, S.R. (2010). Androgens Induce Functional CXCR4 through ERG Factor Expression in TMPRSS2-ERG Fusion-Positive Prostate Cancer Cells. *Transl. Oncol.* **3**, 195–203.
46. Campisi, J., Andersen, J.K., Kapahi, P., and Melov, S. (2011). Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin. Cancer Biol.* **21**, 354–359.
47. Cao, M., Seike, M., Soeno, C., Mizutani, H., Kitamura, K., Minegishi, Y., Noro, R., Yoshimura, A., Cai, L., and Gemma, A. (2012). MiR-23a regulates TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition by targeting E-cadherin in lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* **41**, 869–875.
48. Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D.V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443–446.
49. Carpén, O., Pallai, P., Staunton, D.E., and Springer, T.A. (1992). Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin. *J. Cell Biol.* **118**, 1223–1234.
50. Carvajal, D., Tovar, C., Yang, H., Vu, B.T., Heimbrook, D.C., and Vassilev, L.T. (2005). Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res.* **65**, 1918–1924.
51. Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C.J., and Yang, J. (2011). Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis.

- Cancer Res. 71, 245–254.
52. Castro Alves, C., Rosivatz, E., Schott, C., Hollweck, R., Becker, I., Sarbia, M., Carneiro, F., and Becker, K.-F. (2007). Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin. *J. Pathol.* 211, 507–515.
  53. Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118–132.
  54. Cha, Y.H., Kim, N.H., Park, C., Lee, I., Kim, H.S., and Yook, J.I. (2012). MiRNA-34 intrinsically links p53 tumor suppressor and Wnt signaling. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 1273–1281.
  55. Chakrabarti, R., Hwang, J., Andres Blanco, M., Wei, Y., Lukačšin, M., Romano, R.-A., Smalley, K., Liu, S., Yang, Q., Ibrahim, T., et al. (2012). Elf5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nat. Cell Biol.* 14, 1212–1222.
  56. Chamberlain, E.M., and Sanders, M.M. (1999). Identification of the novel player deltaEF1 in estrogen transcriptional cascades. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3600–3606.
  57. Chang, C.-J., Chao, C.-H., Xia, W., Yang, J.-Y., Xiong, Y., Li, C.-W., Yu, W.-H., Rehman, S.K., Hsu, J.L., Lee, H.-H., et al. (2011a). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat. Cell Biol.* 13, 317–323.
  58. Chang, C.-J., Hsu, C.-C., Chang, C.-H., Tsai, L.-L., Chang, Y.-C., Lu, S.-W., Yu, C.-H., Huang, H.-S., Wang, J.-J., Tsai, C.-H., et al. (2011b). Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancer. *Oncol. Rep.* 26, 1003–1010.
  59. Chau, T.-L., Gioia, R., Gatot, J.-S., Patrascu, F., Carpentier, I., Chapelle, J.-P., O'Neill, L., Beyaert, R., Piette, J., and Chariot, A. (2008). Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated? *Trends Biochem. Sci.* 33, 171–180.
  60. Chen, C., Mu, C., Qu, Q., Zhu, Y., Sun, J., Zhang, X., and Huang, J. (2009). [The Expression and Biological Significance of PD-L1 on Lung Cancer Cell Lines.]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi Chin. J. Lung Cancer* 12, 859–863.
  61. Chen, D.S., Irving, B.A., and Hodi, F.S. (2012a). Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy—Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1. *Clin. Cancer Res.* 18, 6580–6587.
  62. Chen, J., Feng, Y., Lu, L., Wang, H., Dai, L., Li, Y., and Zhang, P. (2012b). Interferon-γ-induced PD-L1 surface expression on human oral squamous carcinoma via PKD2 signal pathway. *Immunobiology* 217, 385–393.
  63. Chen, M.-L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 419–424.
  64. Chen, X., Liu, S., Wang, L., Zhang, W., Ji, Y., and Ma, X. (2008). Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia. *Cancer Biol. Ther.* 7, 622–627.
  65. Chen, Y., Banda, M., Speyer, C.L., Smith, J.S., Rabson, A.B., and Gorski, D.H. (2010). Regulation of the expression and activity of the antiangiogenic homeobox gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and microRNA-221. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3902–3913.
  66. Chen, Y., Mu, C.-Y., and Huang, J.-A. (2012c). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori* 98, 751–755.
  67. Cheng, A., Guo, J., Henderson-Jackson, E., Kim, D., Malafa, M., and Coppola, D. (2011a). IkB

- Kinase ε expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **136**, 60–66.
68. Cheng, C.W., Wu, P.E., Yu, J.C., Huang, C.S., Yue, C.T., Wu, C.W., and Shen, C.Y. (2001). Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* **20**, 3814–3823.
69. Cheng, G.Z., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, C.D., and Wang, L.-H. (2007a). Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* **67**, 1979–1987.
70. Cheng, G.Z., Zhang, W.Z., Sun, M., Wang, Q., Coppola, D., Mansour, M., Xu, L.M., Costanzo, C., Cheng, J.Q., and Wang, L.-H. (2008). Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function. *J. Biol. Chem.* **283**, 14665–14673.
71. Cheng, J., Liu, C., Koopman, W.J., and Mountz, J.D. (1995). Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region. *J. Immunol. Baltim. Md* **154**, 1239–1245.
72. Cheng, X., Zhao, Z., Ventura, E., Gran, B., Shindler, K.S., and Rostami, A. (2007b). The PD-1/PD-L pathway is up-regulated during IL-12-induced suppression of EAE mediated by IFN-gamma. *J. Neuroimmunol.* **185**, 75–86.
73. Cheng, Z.-X., Sun, B., Wang, S.-J., Gao, Y., Zhang, Y.-M., Zhou, H.-X., Jia, G., Wang, Y.-W., Kong, R., Pan, S.-H., et al. (2011b). Nuclear Factor-κB-Dependent Epithelial to Mesenchymal Transition Induced by HIF-1α Activation in Pancreatic Cancer Cells under Hypoxic Conditions. *PLoS ONE* **6**, e23752.
74. Chernov, M.V., Ramana, C.V., Adler, V.V., and Stark, G.R. (1998). Stabilization and activation of p53 are regulated independently by different phosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 2284–2289.
75. Cheung, P., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2000a). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**, 263–271.
76. Cheung, P., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2000b). Signaling to Chromatin through Histone Modifications. *Cell* **103**, 263–271.
77. Chin, D., Boyle, G.M., Parsons, P.G., and Coman, W.B. (2004). What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? *Br. J. Plast. Surg.* **57**, 215–221.
78. Choi, W., Shah, J.B., Tran, M., Svatek, R., Marquis, L., Lee, I.-L., Yu, D., Adam, L., Wen, S., Shen, Y., et al. (2012). p63 expression defines a lethal subset of muscle-invasive bladder cancers. *PloS One* **7**, e30206.
79. Choi, Y.-J., Kang, L.-J., and Lee, S.-G. (2014). Stimulation of DDX3 expression by ginsenoside Rg3 through the Akt/p53 pathway activates the innate immune response via TBK1/IKKε/IRF3 signalling. *Curr. Med. Chem.* **21**, 1050–1060.
80. Christoffersen, N.R., Silahtaroglu, A., Orom, U.A., Kauppinen, S., and Lund, A.H. (2007). miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFHXB1B. *RNA N. Y. N* **13**, 1172–1178.
81. Chua, H.L., Bhat-Nakshatri, P., Clare, S.E., Morimiya, A., Badve, S., and Nakshatri, H. (2007). NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* **26**, 711–724.
82. Chuang, M.-J., Sun, K.-H., Tang, S.-J., Deng, M.-W., Wu, Y.-H., Sung, J.-S., Cha, T.-L., and Sun, G.-H. (2008). Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci.* **99**, 905–913.
83. Ciechomska, M., van Laar, J.M., and O'Reilly, S. (2014). Emerging role of epigenetics in

- systemic sclerosis pathogenesis. *Genes Immun.* **15**, 433–439.
- 84. Cieply, B., Riley, P., 4th, Pifer, P.M., Widmeyer, J., Addison, J.B., Ivanov, A.V., Denvir, J., and Frisch, S.M. (2012). Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by Grainyhead-like-2. *Cancer Res.* **72**, 2440–2453.
  - 85. Côme, C., Magnino, F., Bibeau, F., De Santa Barbara, P., Becker, K.F., Theillet, C., and Savagner, P. (2006). Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 5395–5402.
  - 86. Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* **7**, 1267–1278.
  - 87. Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., and Ben-Ze'ev, A. (2002). The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Invest.* **109**, 987–991.
  - 88. Cozens-Roberts, C., Lauffenburger, D.A., and Quinn, J.A. (1990). Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. I. Probabilistic model and analysis. *Biophys. J.* **58**, 841–856.
  - 89. Crane, C.A., Panner, A., Murray, J.C., Wilson, S.P., Xu, H., Chen, L., Simko, J.P., Waldman, F.M., Pieper, R.O., and Parsa, A.T. (2009). PI(3) kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer. *Oncogene* **28**, 306–312.
  - 90. Crawford, H.C., Fingleton, B.M., Rudolph-Owen, L.A., Goss, K.J., Rubinfeld, B., Polakis, P., and Matrisian, L.M. (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* **18**, 2883–2891.
  - 91. Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H., and Allison, J.P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4275–4280.
  - 92. Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, À., Beltran, M., Peiró, S., and de Herreros, A.G. (2011). Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **286**, 12024–12032.
  - 93. Demir, A.Y., Groothuis, P.G., Nap, A.W., Punyadeera, C., de Goeij, A.F.P.M., Evers, J.L.H., and Dunselman, G.A.J. (2004). Menstrual effluent induces epithelial-mesenchymal transitions in mesothelial cells. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **19**, 21–29.
  - 94. Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. (2000). Activation of the IκB Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell* **103**, 351–361.
  - 95. Deng, W., Gowen, B.G., Zhang, L., Wang, L., Lau, S., Iannello, A., Xu, J., Rovis, T.L., Xiong, N., and Raulet, D.H. (2015). Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science* **348**, 136–139.
  - 96. Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577–584.
  - 97. Derynck, R., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* **29**, 117–129.
  - 98. Desbois, M., Champiat, S., and Chaput, N. (2015). Lever la tolérance immunitaire en cancérologie. *Bull. Cancer (Paris)* **102**, 34–52.
  - 99. Diamond, M.S., Staunton, D.E., de Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L., and Springer, T.A. (1990). ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* **111**, 3129–3139.

100. Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N., and Raulet, D.H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat. Immunol.* **1**, 119–126.
101. Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* **413**, 165–171.
102. Diefenbach, A., Hsia, J.K., Hsiung, M.-Y.B., and Raulet, D.H. (2003). A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* **33**, 381–391.
103. Dijkers, E.C.F., Kosterink, J.G.W., Rademaker, A.P., Perk, L.R., van Dongen, G.A.M.S., Bart, J., de Jong, J.R., de Vries, E.G.E., and Lub-de Hooge, M.N. (2009). Development and characterization of clinical-grade <sup>89</sup>Zr-trastuzumab for HER2/neu immunoPET imaging. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **50**, 974–981.
104. Dohadwala, M., Yang, S.-C., Luo, J., Sharma, S., Batra, R.K., Huang, M., Lin, Y., Goodlick, L., Krysan, K., Fishbein, M.C., et al. (2006). Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **66**, 5338–5345.
105. Domagala, W., Woźniak, L., Lasota, J., Weber, K., and Osborn, M. (1990). Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary, but not in lobular breast carcinomas. *Am. J. Pathol.* **137**, 1059–1064.
106. Domagala-Kulawik, J., Osinska, I., and Hoser, G. (2014). Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **3**, 15–22.
107. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* **5**, 1365–1369.
108. Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793–800.
109. Dougan, M., and Dranoff, G. (2009). Immune therapy for cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 83–117.
110. Drake, C.G., Jaffee, E., and Pardoll, D.M. (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv. Immunol.* **90**, 51–81.
111. Drake, C.G., Lipson, E.J., and Brahmer, J.R. (2014). Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 24–37.
112. Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 11–22.
113. Dumont, N., and Arteaga, C.L. (2003). Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell* **3**, 531–536.
114. Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 836–848.
115. Dupont, S., Zacchigna, L., Adorno, M., Soligo, S., Volpin, D., Piccolo, S., and Cordenonsi, M. (2004). Convergence of p53 and TGF-beta signaling networks. *Cancer Lett.* **213**, 129–138.
116. Dykxhoorn, D.M., Wu, Y., Xie, H., Yu, F., Lal, A., Petrocca, F., Martinvalet, D., Song, E., Lim, B., and Lieberman, J. (2009). miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to

- form distant metastases. *PLoS One* 4, e7181.
117. Eades, G., Yao, Y., Yang, M., Zhang, Y., Chumsri, S., and Zhou, Q. (2011). miR-200a Regulates SIRT1 Expression and Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)-like Transformation in Mammary Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 286, 25992–26002.
118. Eddy, S.F., Guo, S., Demicco, E.G., Romieu-Mourez, R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C., and Sonenshein, G.E. (2005). Inducible IkappaB kinase/IkappaB kinase epsilon expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor-kappaB activation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 65, 11375–11383.
119. Egan, L.J., Eckmann, L., Greten, F.R., Chae, S., Li, Z.-W., Myhre, G.M., Robine, S., Karin, M., and Kagnoff, M.F. (2004). IkappaB-kinasebeta-dependent NF-kappaB activation provides radioprotection to the intestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2452–2457.
120. Ekoff, M., Kaufmann, T., Engström, M., Motoyama, N., Villunger, A., Jönsson, J.-I., Strasser, A., and Nilsson, G. (2007). The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation-induced apoptosis of mast cells. *Blood* 110, 3209–3217.
121. Elloul, S., Elstrand, M.B., Nesland, J.M., Tropé, C.G., Kvalheim, G., Goldberg, I., Reich, R., and Davidson, B. (2005). Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 103, 1631–1643.
122. Elloul, S., Silins, I., Tropé, C.G., Benshushan, A., Davidson, B., and Reich, R. (2006). Expression of E-cadherin transcriptional regulators in ovarian carcinoma. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 449, 520–528.
123. Evan, G.I., and Vousden, K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342–348.
124. Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., Sorokin, A., Ovchinnikov, L.P., Davicioni, E., Triche, T.J., et al. (2009). Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell* 15, 402–415.
125. Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Lin, A.W., Querido, E., McCurrach, M.E., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2002). Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3497–3508.
126. Fincham, J.R.S. (1997). Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Edited by V. E. A. Russo, R. A. Martienssen and A. D. Riggs. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. 693+xii pages. Price \$125. ISBN 0 87969 490 4. *Genet. Res.* 69, 159–162.
127. Finnberg, N., and El-Deiry, W.S. (2004). Activating FOXO3a, NF-kappaB and p53 by targeting IKKs: An effective multi-faceted targeting of the tumor-cell phenotype? *Cancer Biol. Ther.* 3, 614–616.
128. Firulli, B.A., Krawchuk, D., Centonze, V.E., Vargesson, N., Virshup, D.M., Conway, S.J., Cserjesi, P., Laufer, E., and Firulli, A.B. (2005). Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities. *Nat. Genet.* 37, 373–381.
129. Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491–496.
130. Flores, E.R., Sengupta, S., Miller, J.B., Newman, J.J., Bronson, R., Crowley, D., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. (2005). Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 7, 363–373.

131. Francí, C., Gallén, M., Alameda, F., Baró, T., Iglesias, M., Virtanen, I., and García de Herreros, A. (2009). Snail1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours. *PloS One* 4, e5595.
132. Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206, 3015–3029.
133. Franco, H.L., Casasnovas, J., Rodriguez-Medina, J.R., and Cadilla, C.L. (2011). Redundant or separate entities?--roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 39, 1177–1186.
134. Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027–1034.
135. Fu, J., Qin, L., He, T., Qin, J., Hong, J., Wong, J., Liao, L., and Xu, J. (2011). The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res.* 21, 275–289.
136. Fujita, F., Taniguchi, Y., Kato, T., Narita, Y., Furuya, A., Ogawa, T., Sakurai, H., Joh, T., Itoh, M., Delhase, M., et al. (2003). Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7780–7793.
137. Futamura, M., Kamino, H., Miyamoto, Y., Kitamura, N., Nakamura, Y., Ohnishi, S., Masuda, Y., and Arakawa, H. (2007). Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res.* 67, 1451–1460.
138. Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* 14, 1014–1022.
139. Gao, D., Vahdat, L.T., Wong, S., Chang, J.C., and Mittal, V. (2012). Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. *Cancer Res.* 72, 4883–4889.
140. Gao, Q., Wang, X.-Y., Qiu, S.-J., Yamato, I., Sho, M., Nakajima, Y., Zhou, J., Li, B.-Z., Shi, Y.-H., Xiao, Y.-S., et al. (2009). Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 971–979.
141. Garg, M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J. Stem Cells* 5, 188–195.
142. Gatot, J.-S., Gioia, R., Chau, T.-L., Patrascu, F., Warnier, M., Close, P., Chapelle, J.-P., Muraille, E., Brown, K., Siebenlist, U., et al. (2007). Lipopolysaccharide-mediated interferon regulatory factor activation involves TBK1-IKKepsilon-dependent Lys(63)-linked polyubiquitination and phosphorylation of TANK/I-TRAF. *J. Biol. Chem.* 282, 31131–31146.
143. Gemmill, R.M., Roche, J., Potiron, V.A., Nasarre, P., Mitas, M., Coldren, C.D., Helfrich, B.A., Garrett-Mayer, E., Bunn, P.A., and Drabkin, H.A. (2011). ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 300, 66–78.
144. Geradts, J., de Herreros, A.G., Su, Z., Burchette, J., Broadwater, G., and Bachelder, R.E. (2011). Nuclear Snail1 and nuclear ZEB1 protein expression in invasive and intraductal human breast carcinomas. *Hum. Pathol.* 42, 1125–1131.
145. Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E.,

- Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–892.
146. Gershengorn, M.C., Hardikar, A.A., Wei, C., Geras-Raaka, E., Marcus-Samuels, B., and Raaka, B.M. (2004). Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* **306**, 2261–2264.
147. Ghebeh, H., Mohammed, S., Al-Omair, A., Qattan, A., Lehe, C., Al-Qudaihi, G., Elkum, N., Alshabanah, M., Bin Amer, S., Tulbah, A., et al. (2006). The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia N. Y. N* **8**, 190–198.
148. Gheldof, A., Hulpiau, P., van Roy, F., De Craene, B., and Berx, G. (2012). Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci. CMSL* **69**, 2527–2541.
149. Ghiringhelli, F., Ménard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., et al. (2005a). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* **202**, 1075–1085.
150. Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005b). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* **202**, 919–929.
151. Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* **18**, 2046–2059.
152. Ginnebaugh, K.R., Ahmad, A., and Sarkar, F.H. (2014). The therapeutic potential of targeting the epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets.*
153. 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.
154. Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Kletsas, D., Mariatos, G., Zoumpourlis, V., Ryan, K.M., Kittas, C., and Papavassiliou, A.G. (2003). p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-κB-independent manner. *EMBO J.* **22**, 1567–1578.
155. Grady, W.M., and Markowitz, S.D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **3**, 101–128.
156. Graham, T.R., Zhau, H.E., Odero-Marah, V.A., Osunkoya, A.O., Kimbro, K.S., Tighiouart, M., Liu, T., Simons, J.W., and O'Regan, R.M. (2008). Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 2479–2488.
157. Graham, T.R., Yacoub, R., Taliaferro-Smith, L., Osunkoya, A.O., Odero-Marah, V.A., Liu, T., Kimbro, K.S., Sharma, D., and O'Regan, R.M. (2010). Reciprocal regulation of ZEB1 and AR in triple negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 139–147.
158. Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **10**, 593–601.
159. Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405–413.
160. Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**, 734–738.

161. Grootelaes, M.L., and Frisch, S.M. (2000). Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* **19**, 3823–3828.
162. Grosso, J.F., Kelleher, C.C., Harris, T.J., Maris, C.H., Hipkiss, E.L., De Marzo, A., Anders, R., Netto, G., Getnet, D., Bruno, T.C., et al. (2007). LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *J. Clin. Invest.* **117**, 3383–3392.
163. Grothey, A., Heistermann, P., Philippou, S., and Voigtmann, R. (1998). Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in patients with non-small-cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage. *Br. J. Cancer* **77**, 801–807.
164. Grzelewski-Rzymowska, I., and Pietrzkowicz, M. (2004). [Role of intra cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and its soluble form (sICAM) in chronic airway inflammation]. *Pol. Merkur. Lek. Organ Pol. Tow. Lek.* **16**, 179–182.
165. Guaita, S., Puig, I., Franci, C., Garrido, M., Dominguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., De Herreros, A.G., and Baulida, J. (2002). Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 39209–39216.
166. Gui, T., Sun, Y., Shimokado, A., and Muragaki, Y. (2012). The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Signal Transduct.* **2012**, e289243.
167. Guo, J.-P., Shu, S.-K., He, L., Lee, Y.-C., Kruk, P.A., Grenman, S., Nicosia, S.V., Mor, G., Schell, M.J., Coppola, D., et al. (2009). Dereulation of IKBKE is associated with tumor progression, poor prognosis, and cisplatin resistance in ovarian cancer. *Am. J. Pathol.* **175**, 324–333.
168. Guo, J.-P., Shu, S.-K., Esposito, N.N., Coppola, D., Koomen, J.M., and Cheng, J.Q. (2010). IKKepsilon phosphorylation of estrogen receptor alpha Ser-167 and contribution to tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Biol. Chem.* **285**, 3676–3684.
169. Haak-Frendscho, M., Wynn, T.A., Czuprynski, C.J., and Paulnock, D. (1990). Transforming growth factor-beta 1 inhibits activation of macrophage cell line RAW 264.7 for cell killing. *Clin. Exp. Immunol.* **82**, 404–410.
170. Häcker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.-C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Häcker, G., et al. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**, 204–207.
171. Hahne, M., Rimoldi, D., Schröter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., et al. (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**, 1363–1366.
172. Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Higuchi, T., Yagi, H., Takakura, K., Minato, N., et al. (2007). Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3360–3365.
173. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674.
174. Hartwell, K.A., Muir, B., Reinhardt, F., Carpenter, A.E., Sgroi, D.C., and Weinberg, R.A. (2006). The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18969–18974.

175. Hay, E.D., and Zuk, A. (1995). Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **26**, 678–690.
176. Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.* **18**, 2195–2224.
177. Hayes, S.H., and Seigel, G.M. (2009). Immunoreactivity of ICAM-1 in Human Tumors, Metastases and Normal Tissues. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2**, 553–560.
178. Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636.
179. Heiska, L., Alftan, K., Grönholm, M., Vilja, P., Vaheri, A., and Carpén, O. (1998). Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 21893–21900.
180. Heldin, C.-H., Vanlandewijck, M., and Moustakas, A. (2012). Regulation of EMT by TGF $\beta$  in cancer. *FEBS Lett.* **586**, 1959–1970.
181. Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* **199**, 1641–1650.
182. Hermeking, H. (2012). MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 613–626.
183. Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Honjo, T., Okazaki, T., and Tokura, Y. (2010). Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* **116**, 1757–1766.
184. Hoek, K., Rimm, D.L., Williams, K.R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., Kluger, H.M., Berger, A.J., Cheng, E., Trombetta, E.S., et al. (2004). Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.* **64**, 5270–5282.
185. Hoesel, B., and Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* **12**, 86.
186. Holm, T.M., Habashi, J.P., Doyle, J.J., Bedja, D., Chen, Y., Erp, C. van, Lindsay, M.E., Kim, D., Schoenhoff, F., Cohn, R.D., et al. (2011). Noncanonical TGF $\beta$  Signaling Contributes to Aortic Aneurysm Progression in Marfan Syndrome Mice. *Science* **332**, 358–361.
187. Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., et al. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772–777.
188. Hori, T., Kondo, T., Kanamori, M., Tabuchi, Y., Ogawa, R., Zhao, Q.-L., Ahmed, K., Yasuda, T., Seki, S., Suzuki, K., et al. (2010). Nutlin-3 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) in human sarcoma HOS cells and human colon cancer HCT116 cells. *Cancer Lett.* **287**, 98–108.
189. Horiguchi, K., Shirakihara, T., Nakano, A., Imamura, T., Miyazono, K., and Saitoh, M. (2009). Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **284**, 245–253.
190. Hosono, S., Kajiyama, H., Terauchi, M., Shibata, K., Ino, K., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2007). Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients. *Br. J. Cancer* **96**, 314–320.
191. Hotz, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H.-J., and Hotz, H.G. (2007).

- Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 4769–4776.
192. Hsu, M.-C., Hsiao, J.-R., Chang, K.-C., Wu, Y.-H., Su, I.-J., Jin, Y.-T., and Chang, Y. (2010). Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **23**, 1393–1403.
  193. Hsu, S., Kim, M., Hernandez, L., Grajales, V., Noonan, A., Anver, M., Davidson, B., and Annunziata, C.M. (2012). IKK-ε coordinates invasion and metastasis of ovarian cancer. *Cancer Res.* **72**, 5494–5504.
  194. Huang, B., Yang, X.-D., Lamb, A., and Chen, L.-F. (2010). Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cell. Signal.* **22**, 1282–1290.
  195. Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* **21**, 503–513.
  196. Huang, J., Liu, T., Xu, L.-G., Chen, D., Zhai, Z., and Shu, H.-B. (2005). SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways. *EMBO J.* **24**, 4018–4028.
  197. Huber, A.H., and Weis, W.I. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* **105**, 391–402.
  198. Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* **114**, 569–581.
  199. Huttí, J.E., Shen, R.R., Abbott, D.W., Zhou, A.Y., Sprott, K.M., Asara, J.M., Hahn, W.C., and Cantley, L.C. (2009). Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation. *Mol. Cell* **34**, 461–472.
  200. Ikushima, H., and Miyazono, K. (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 415–424.
  201. Ileana, E., Champiat, S., and Soria, J.-C. (2013). [Immune-checkpoints: the new anti-cancer immunotherapies]. *Bull. Cancer (Paris)* **100**, 601–610.
  202. Imai, T., Horiuchi, A., Wang, C., Oka, K., Ohira, S., Nikaido, T., and Konishi, I. (2003). Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* **163**, 1437–1447.
  203. Inman, B.A., Sebo, T.J., Frigola, X., Dong, H., Bergstrahl, E.J., Frank, I., Fradet, Y., Lacombe, L., and Kwon, E.D. (2007). PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* **109**, 1499–1505.
  204. Inoue, Y., and Imamura, T. (2008). Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci.* **99**, 2107–2112.
  205. Iorio, M.V., and Croce, C.M. (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med.* **4**, 143–159.
  206. Israël, A. (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol.* **10**, 129–133.

207. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12293–12297.
208. Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* **110**, 341–350.
209. Jason, L.J.M., Moore, S.C., Lewis, J.D., Lindsey, G., and Ausio, J. (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* **24**, 166–174.
210. Jewett, A., Wang, M.-Y., Teruel, A., Poupak, Z., Bostanian, Z., and Park, N.-H. (2003). Cytokine dependent inverse regulation of CD54 (ICAM1) and major histocompatibility complex class I antigens by nuclear factor kappaB in HEp2 tumor cell line: effect on the function of natural killer cells. *Hum. Immunol.* **64**, 505–520.
211. Joo, C.H., Shin, Y.C., Gack, M., Wu, L., Levy, D., and Jung, J.U. (2007). Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3. *J. Virol.* **81**, 8282–8292.
212. Kajiyama, H., Hosono, S., Terauchi, M., Shibata, K., Ino, K., Yamamoto, E., Nomura, S., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2006). Twist expression predicts poor clinical outcome of patients with clear cell carcinoma of the ovary. *Oncology* **71**, 394–401.
213. Kallergi, G., Papadaki, M.A., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulias, V., and Agelaki, S. (2011). Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **13**, R59.
214. Kalluri, R., and Neilson, E.G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* **112**, 1776–1784.
215. Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428.
216. Kang, M., Lee, S.-W., Kim, E.-J., and Um, S.-J. (2012). Positive regulation of additional sex comb-like 1 gene expression by the pluripotency factor SOX2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**, 621–626.
217. Karakhanova, S., Meisel, S., Ring, S., Mahnke, K., and Enk, A.H. (2010). ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets. *Eur. J. Immunol.* **40**, 254–266.
218. Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431–436.
219. Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T., and Zhang, Z. (2005). TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir. Res.* **6**, 56.
220. Katsuno, Y., Lamouille, S., and Derynck, R. (2013). TGF- $\beta$  signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr. Opin. Oncol.* **25**, 76–84.
221. Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell* **6**, 1365–1375.
222. Kawata, M., Koinuma, D., Ogami, T., Umezawa, K., Iwata, C., Watabe, T., and Miyazono, K. (2012). TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **151**, 205–216.
223. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in

- tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704.
224. Kenney, P.A., Wszolek, M.F., Rieger-Christ, K.M., Neto, B.S., Gould, J.J., Harty, N.J., Mosquera, J.M., Zeheb, R., Loda, M., Darling, D.S., et al. (2011). Novel ZEB1 expression in bladder tumorigenesis. *BJU Int.* **107**, 656–663.
  225. Kim, H.J., Hawke, N., and Baldwin, A.S. (2006). NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ.* **13**, 738–747.
  226. Kim, N.H., Kim, H.S., Li, X.-Y., Lee, I., Choi, H.-S., Kang, S.E., Cha, S.Y., Ryu, J.K., Yoon, D., Fearon, E.R., et al. (2011a). A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **195**, 417–433.
  227. Kim, T., Veronese, A., Pichiorri, F., Lee, T.J., Jeon, Y.-J., Volinia, S., Pineau, P., Marchio, A., Palatini, J., Suh, S.-S., et al. (2011b). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J. Exp. Med.* **208**, 875–883.
  228. Kim, T.-K., Lee, J.-S., Oh, S.-Y., Jin, X., Choi, Y.-J., Lee, T.-H., Lee, E. ho, Choi, Y.-K., You, S., Chung, Y.G., et al. (2007). Direct transcriptional activation of promyelocytic leukemia protein by IFN regulatory factor 3 induces the p53-dependent growth inhibition of cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 11133–11140.
  229. Kokkinos, M.I., Wafai, R., Wong, M.K., Newgreen, D.F., Thompson, E.W., and Waltham, M. (2007). Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs* **185**, 191–203.
  230. Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J., Coppola, D., Dalton, W.S., and Cheng, J.Q. (2008). MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6773–6784.
  231. Konishi, J., Yamazaki, K., Azuma, M., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., and Nishimura, M. (2004). B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 5094–5100.
  232. Koop, A., Lepenies, I., Braum, O., Davarnia, P., Scherer, G., Fickenscher, H., Kabelitz, D., and Adam-Klages, S. (2011). Novel splice variants of human IKKε negatively regulate IKKε-induced IRF3 and NF-κB activation. *Eur. J. Immunol.* **41**, 224–234.
  233. Koop, S., Schmidt, E.E., MacDonald, I.C., Morris, V.L., Khokha, R., Grattan, M., Leone, J., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1996). Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11080–11084.
  234. Korkaya, H., Liu, S., and Wicha, M.S. (2011). Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J. Clin. Invest.* **121**, 3804–3809.
  235. Korpal, M., Ell, B.J., Buffa, F.M., Ibrahim, T., Blanco, M.A., Celià-Terrassa, T., Mercatali, L., Khan, Z., Goodarzi, H., Hua, Y., et al. (2011). Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat. Med.* **17**, 1101–1108.
  236. Korschning, E., Packeisen, J., Liedtke, C., Hungermann, D., Wülfing, P., van Diest, P.J., Brandt, B., Boecker, W., and Buerger, H. (2005). The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J. Pathol.* **206**, 451–457.
  237. Kozako, T., Yoshimitsu, M., Fujiwara, H., Masamoto, I., Horai, S., White, Y., Akimoto, M., Suzuki, S., Matsushita, K., Uozumi, K., et al. (2009). PD-1/PD-L1 expression in human T-

- cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia* **23**, 375–382.
238. Krambeck, A.E., Dong, H., Thompson, R.H., Kuntz, S.M., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Sebo, T.J., Cheville, J.C., Parker, A.S., et al. (2007). Survivin and b7-h1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 1749–1756.
239. Kravchenko, V.V., Mathison, J.C., Schwamborn, K., Mercurio, F., and Ulevitch, R.J. (2003). IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  Plays a Key Role in Integrating Signals Induced by Pro-inflammatory Stimuli. *J. Biol. Chem.* **278**, 26612–26619.
240. Krishnamachary, B., Zagzag, D., Nagasawa, H., Rainey, K., Okuyama, H., Baek, J.H., and Semenza, G.L. (2006). Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B. *Cancer Res.* **66**, 2725–2731.
241. Kulbacka, J., Saczko, J., Chwilkowska, A., Choromanska, A., and Skouck, N. (2012). Apoptosis, Free Radicals and Antioxidant Defense in Antitumor Therapy. In *Antioxidant Enzyme*, M.A. El-Missiry, ed. (InTech),.
242. Kumar, A., Negi, G., and Sharma, S.S. (2011). JSH-23 targets nuclear factor-kappa B and reverses various deficits in experimental diabetic neuropathy: effect on neuroinflammation and antioxidant defence. *Diabetes Obes. Metab.* **13**, 750–758.
243. Kumar, M., Allison, D.F., Baranova, N.N., Wamsley, J.J., Katz, A.J., Bekiranov, S., Jones, D.R., and Mayo, M.W. (2013). NF- $\kappa$ B regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells. *PloS One* **8**, e68597.
244. Kumar, P.A., Kotlyarevska, K., Dejkhmaron, P., Reddy, G.R., Lu, C., Bhojani, M.S., and Menon, R.K. (2010). Growth hormone (GH)-dependent expression of a natural antisense transcript induces zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) in the glomerular podocyte: a novel action of gh with implications for the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* **285**, 31148–31156.
245. Kumarswamy, R., Mudduluru, G., Ceppi, P., Muppala, S., Kozlowski, M., Niklinski, J., Papotti, M., and Allgayer, H. (2012). MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snai1 and is downregulated in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **130**, 2044–2053.
246. Kurahara, H., Takao, S., Maemura, K., Mataki, Y., Kuwahata, T., Maeda, K., Ding, Q., Sakoda, M., Iino, S., Ishigami, S., et al. (2012). Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition via regulation of ZEB-1 and ZEB-2 expression in pancreatic cancer. *J. Surg. Oncol.* **105**, 655–661.
247. Kwok, W.K., Ling, M.-T., Lee, T.-W., Lau, T.C.M., Zhou, C., Zhang, X., Chua, C.W., Chan, K.W., Chan, F.L., Glackin, C., et al. (2005). Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res.* **65**, 5153–5162.
248. Kyo, S., Sakaguchi, J., Ohno, S., Mizumoto, Y., Maida, Y., Hashimoto, M., Nakamura, M., Takakura, M., Nakajima, M., Masutomi, K., et al. (2006). High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum. Pathol.* **37**, 431–438.
249. Lachner, M., and Jenuwein, T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 286–298.
250. Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196.

251. Lander, R., Nordin, K., and LaBonne, C. (2011). The F-box protein Ppa is a common regulator of core EMT factors Twist, Snail, Slug, and Sip1. *J. Cell Biol.* **194**, 17–25.
252. Larue, L., and Bellacosa, A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* **24**, 7443–7454.
253. Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 261–268.
254. Lazear, H.M., Lancaster, A., Wilkins, C., Suthar, M.S., Huang, A., Vick, S.C., Clepper, L., Thackray, L., Brassil, M.M., Virgin, H.W., et al. (2013). IRF-3, IRF-5, and IRF-7 coordinately regulate the type I IFN response in myeloid dendritic cells downstream of MAVS signaling. *PLoS Pathog.* **9**, e1003118.
255. Leader, M., Collins, M., Patel, J., and Henry, K. (1987). Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. *Histopathology* **11**, 63–72.
256. Lee, J.-C., Lee, K.-M., Kim, D.-W., and Heo, D.S. (2004). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **172**, 7335–7340.
257. Lee, S.H., Jeong, D., Han, Y.-S., and Baek, M.J. (2015). Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Ann. Surg. Treat. Res.* **89**, 1–8.
258. Lee, S.-J., Jang, B.-C., Lee, S.-W., Yang, Y.-I., Suh, S.-I., Park, Y.-M., Oh, S., Shin, J.-G., Yao, S., Chen, L., et al. (2006a). Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-γ-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett.* **580**, 755–762.
259. Lee, T.K., Poon, R.T.P., Yuen, A.P., Ling, M.T., Kwok, W.K., Wang, X.H., Wong, Y.C., Guan, X.Y., Man, K., Chau, K.L., et al. (2006b). Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 5369–5376.
260. Lee, Y.-B., Bantounas, I., Lee, D.-Y., Phylactou, L., Caldwell, M.A., and Uney, J.B. (2009). Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic Acids Res.* **37**, 123–128.
261. Levy, L., and Hill, C.S. (2006). Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 41–58.
262. Li, B., Han, Q., Zhu, Y., Yu, Y., Wang, J., and Jiang, X. (2012a). Down-regulation of miR-214 contributes to intrahepatic cholangiocarcinoma metastasis by targeting Twist. *FEBS J.* **279**, 2393–2398.
263. Li, C.-W., Xia, W., Huo, L., Lim, S.-O., Wu, Y., Hsu, J.L., Chao, C.-H., Yamaguchi, H., Yang, N.-K., Ding, Q., et al. (2012b). Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-α requires NF-κB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.* **72**, 1290–1300.
264. Li, H., Chen, L., Zhang, A., Wang, G., Han, L., Yu, K., Pu, P., Kang, C., and Huang, Q. (2012c). Silencing of IKKε using siRNA inhibits proliferation and invasion of glioma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* **41**, 169–178.
265. Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K.L., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 99–146.
266. Li, Q., Sun, H., Zou, J., Ge, C., Yu, K., Cao, Y., and Hong, Q. (2013). Increased expression of estrogen receptor α-36 by breast cancer oncogene IKKε promotes growth of

- ER-negative breast cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **31**, 833–841.
267. Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B.K., and Lu, J. (2010). Requirement of the Histone Demethylase LSD1 in Snai1-mediated Transcriptional Repression during Epithelial-Mesenchymal Transition. *Oncogene* **29**, 4896–4904.
268. Liu, X. (2008). Inflammatory cytokines augments TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating TbetaR-I. *Cell Motil. Cytoskeleton* **65**, 935–944.
269. Liu, Y. (2004). Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **15**, 1–12.
270. Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczkowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A., and Quesnel, B. (2007a). Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-{gamma} and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* **110**, 296–304.
271. Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczkowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A., and Quesnel, B. (2007b). Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-{gamma} and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* **110**, 296–304.
272. Liu, Y., El-Naggar, S., Darling, D.S., Higashi, Y., and Dean, D.C. (2008). Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Dev. Camb. Engl.* **135**, 579–588.
273. Liu, Y.-N., Abou-Kheir, W., Yin, J.J., Fang, L., Hynes, P., Casey, O., Hu, D., Wan, Y., Seng, V., Sheppard-Tillman, H., et al. (2012). Critical and reciprocal regulation of KLF4 and SLUG in transforming growth factor  $\beta$ -initiated prostate cancer epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 941–953.
274. Liu, Y.-N., Yin, J.J., Abou-Kheir, W., Hynes, P.G., Casey, O.M., Fang, L., Yi, M., Stephens, R.M., Seng, V., Sheppard-Tillman, H., et al. (2013). MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms. *Oncogene* **32**, 296–306.
275. Lo, H.-W., Hsu, S.-C., Xia, W., Cao, X., Shih, J.-Y., Wei, Y., Abbruzzese, J.L., Hortobagyi, G.N., and Hung, M.-C. (2007). Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res.* **67**, 9066–9076.
276. Loke, P., and Allison, J.P. (2003). PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5336–5341.
277. Lomaga, M.A., Yeh, W.C., Sarosi, I., Duncan, G.S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., et al. (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* **13**, 1015–1024.
278. Longley, D.B., Allen, W.L., McDermott, U., Wilson, T.R., Latif, T., Boyer, J., Lynch, M., and Johnston, P.G. (2004). The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating Fas-mediated apoptosis in response to antimetabolites. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 3562–3571.
279. López-Novoa, J.M., and Nieto, M.A. (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol. Med.* **1**, 303–314.
280. Ma, D., and Niederkorn, J.Y. (1995). Transforming growth factor-beta down-regulates

- major histocompatibility complex class I antigen expression and increases the susceptibility of uveal melanoma cells to natural killer cell-mediated cytosis. *Immunology* **86**, 263–269.
281. Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* **449**, 682–688.
282. MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **17**, 9–26.
283. MacKeigan, J.P., Murphy, L.O., and Blenis, J. (2005). Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat. Cell Biol.* **7**, 591–600.
284. Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715.
285. Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 231–237.
286. Mareel, M., Vleminckx, K., Vermeulen, S., Yan, G., Bracke, M., and van Roy, F. (1994). Downregulation in vivo of the invasion-suppressor molecule E-cadherin in experimental and clinical cancer. *Princess Takamatsu Symp.* **24**, 63–80.
287. Marlin, S.D., and Springer, T.A. (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* **51**, 813–819.
288. Martin, T.A., Goyal, A., Watkins, G., and Jiang, W.G. (2005). Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **12**, 488–496.
289. Martínez, V.G., Hidalgo, L., Valencia, J., Hernández-López, C., Entrena, A., del Amo, B.G., Zapata, A.G., Vicente, A., Sacedón, R., and Varas, A. (2014). Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1031–1038.
290. Marzec, M., Zhang, Q., Goradia, A., Raghunath, P.N., Liu, X., Paessler, M., Wang, H.Y., Wysocka, M., Cheng, M., Ruggeri, B.A., et al. (2008). Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20852–20857.
291. Masciarelli, S., Fontemaggi, G., Di Agostino, S., Donzelli, S., Carcarino, E., Strano, S., and Blandino, G. (2014). Gain-of-function mutant p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of cultured tumor cells. *Oncogene* **33**, 1601–1608.
292. Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791.
293. Massagué, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**, 215–230.
294. Massagué, J. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616–630.
295. McConkey, D.J., Choi, W., Marquis, L., Martin, F., Williams, M.B., Shah, J., Svatek, R., Das, A., Adam, L., Kamat, A., et al. (2009). Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 335–344.
296. McDermott, U., Longley, D.B., Galligan, L., Allen, W., Wilson, T., and Johnston, P.G. (2005). Effect of p53 status and STAT1 on chemotherapy-induced, Fas-mediated apoptosis in colorectal cancer. *Cancer Res.* **65**, 8951–8960.
297. Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–489.
298. Merlo, L.M.F., Pepper, J.W., Reid, B.J., and Maley, C.C. (2006). Cancer as an

- evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 924–935.
299. Meulemans, D., and Bronner-Fraser, M. (2004). Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev. Cell* **7**, 291–299.
300. Mimura, K., Kua, L.-F., Shiraishi, K., Kee Siang, L., Shabbir, A., Komachi, M., Suzuki, Y., Nakano, T., Yong, W.-P., So, J., et al. (2014). Inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway can induce upregulation of human leukocyte antigen class I without PD-L1-upregulation in contrast to interferon- $\gamma$  treatment. *Cancer Sci.* **105**, 1236–1244.
301. Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H., and Komuro, I. (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* **105**, 1541–1544.
302. Mironchik, Y., Winnard, P.T., Jr, Vesuna, F., Kato, Y., Wildes, F., Pathak, A.P., Kominsky, S., Artemov, D., Bhujwalla, Z., Van Diest, P., et al. (2005). Twist overexpression induces *in vivo* angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res.* **65**, 10801–10809.
303. Miyoshi, A., Kitajima, Y., Kido, S., Shimonishi, T., Matsuyama, S., Kitahara, K., and Miyazaki, K. (2005). Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* **92**, 252–258.
304. Mizuguchi, Y., Specht, S., Lunz, J.G., 3rd, Isse, K., Corbitt, N., Takizawa, T., and Demetris, A.J. (2012). Cooperation of p300 and PCAF in the control of microRNA 200c/141 transcription and epithelial characteristics. *PloS One* **7**, e32449.
305. Molina-Ortiz, P., Villarejo, A., MacPherson, M., Santos, V., Montes, A., Souchelnytskyi, S., Portillo, F., and Cano, A. (2012). Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction: modulation by serine 4 phosphorylation. *PloS One* **7**, e36132.
306. Monney, L., Sabatos, C.A., Gaglia, J.L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E.A., Coyle, A.J., Sobel, R.A., et al. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536–541.
307. Moody, S.E., Perez, D., Pan, T., Sarkisian, C.J., Portocarrero, C.P., Sternher, C.J., Notorfrancesco, K.L., Cardiff, R.D., and Chodosh, L.A. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* **8**, 197–209.
308. Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS One* **3**, e2888.
309. Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrió, D., Peinado, H., Rodríguez-Pinilla, S.M., Villa, S., Bolós, V., Jordá, M., Fabra, A., Portillo, F., et al. (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* **66**, 9543–9556.
310. Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.* **14 Spec No 1**, R47–R58.
311. Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**, 521–529.
312. Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2009). The regulation of TGFbeta signal transduction. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 3699–3714.
313. Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2012). Induction of epithelial-mesenchymal

- transition by transforming growth factor  $\beta$ . *Semin. Cancer Biol.* **22**, 446–454.
314. Muenst, S., Schaeiri, A.R., Gao, F., Däster, S., Trella, E., Drosler, R.A., Muraro, M.G., Zajac, P., Zanetti, R., Gillanders, W.E., et al. (2014). Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **146**, 15–24.
315. Mühlbauer, M., Fleck, M., Schütz, C., Weiss, T., Froh, M., Blank, C., Schölmerich, J., and Hellerbrand, C. (2006). PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J. Hepatol.* **45**, 520–528.
316. Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., et al. (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.* **188**, 2033–2045.
317. Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Bourdon, J.C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E., and Reisdorf, P. (2000). Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 3867–3872.
318. Myatt, S.S., and Lam, E.W.-F. (2007). The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 847–859.
319. Myers, C.L., Wertheimer, S.J., Schembri-King, J., Parks, T., and Wallace, R.W. (1992). Induction of ICAM-1 by TNF-alpha, IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am. J. Physiol.* **263**, C767–C772.
320. Nagata, S. (1996). Fas ligand and immune evasion. *Nat. Med.* **2**, 1306–1307.
321. Nairismägi, M.-L., Vislovukh, A., Meng, Q., Kratassiouk, G., Beldiman, C., Petretich, M., Groisman, R., Füchtbauer, E.-M., Harel-Bellan, A., and Groisman, I. (2012). Translational control of TWIST1 expression in MCF-10A cell lines recapitulating breast cancer progression. *Oncogene* **31**, 4960–4966.
322. Nakanishi, J., Wada, Y., Matsumoto, K., Azuma, M., Kikuchi, K., and Ueda, S. (2007). Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol. Immunother.* **CII 56**, 1173–1182.
323. Nakhaei, P., Sun, Q., Solis, M., Mesplede, T., Bonneil, E., Paz, S., Lin, R., and Hiscott, J. (2012). I $\beta$ B Kinase ?-Dependent Phosphorylation and Degradation of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Sensitizes Cells to Virus-Induced Apoptosis. *J. Virol.* **86**, 726–737.
324. Nardella, C., Clohessy, J.G., Alimonti, A., and Pandolfi, P.P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 503–511.
325. Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703–716.
326. Nawshad, A., Medici, D., Liu, C.-C., and Hay, E.D. (2007). TGFbeta3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex. *J. Cell Sci.* **120**, 1646–1653.
327. Ng, S.-L., Friedman, B.A., Schmid, S., Gertz, J., Myers, R.M., tenOever, B.R., and Maniatis, T. (2011a). I $\beta$ B kinase (IKK ) regulates the balance between type I and type II interferon responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 21170–21175.
328. Ng, S.-L., Friedman, B.A., Schmid, S., Gertz, J., Myers, R.M., Tenover, B.R., and Maniatis, T. (2011b). I $\beta$ B kinase epsilon (IKK(epsilon)) regulates the balance between type I and type II interferon responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 21170–21175.

329. Nguyen, L.T., and Ohashi, P.S. (2015). Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 45–56.
330. Ni, L., Ma, C.J., Zhang, Y., Nandakumar, S., Zhang, C.L., Wu, X.Y., Borthwick, T., Hamati, A., Chen, X.Y., Kumaraguru, U., et al. (2011). PD-1 modulates regulatory T cells and suppresses T-cell responses in HCV-associated lymphoma. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 535–539.
331. Nicolini, A., Carpi, A., and Rossi, G. (2006). Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 325–337.
332. Nieto, M.A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 155–166.
333. Niu, R.F., Zhang, L., Xi, G.M., Wei, X.Y., Yang, Y., Shi, Y.R., and Hao, X.S. (2007). Up-regulation of Twist induces angiogenesis and correlates with metastasis in hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **26**, 385–394.
334. Noë, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H.C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L.M., and Mareel, M. (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J. Cell Sci.* **114**, 111–118.
335. Noh, H., Hu, J., Wang, X., Xia, X., Satelli, A., and Li, S. (2015). Immune checkpoint regulator PD-L1 expression on tumor cells by contacting CD11b positive bone marrow derived stromal cells. *Cell Commun. Signal. CCS* **13**, 14.
336. 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-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.* **211**, 781–790.
337. Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., Hamada, K., Kubo, A., Kanehiro, H., Nakamura, S., Enomoto, K., Yagita, H., Azuma, M., et al. (2007). Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 2151–2157.
338. Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23–28.
339. Ohigashi, Y., Sho, M., Yamada, Y., Tsurui, Y., Hamada, K., Ikeda, N., Mizuno, T., Yoriki, R., Kashizuka, H., Yane, K., et al. (2005). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 2947–2953.
340. Ohuchida, K., Mizumoto, K., Ohhashi, S., Yamaguchi, H., Konomi, H., Nagai, E., Yamaguchi, K., Tsuneyoshi, M., and Tanaka, M. (2007). Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **120**, 1634–1640.
341. Okugawa, Y., Toiyama, Y., Tanaka, K., Matsusita, K., Fujikawa, H., Saigusa, S., Ohi, M., Inoue, Y., Mohri, Y., Uchida, K., et al. (2012). Clinical significance of Zinc finger E-box Binding homeobox 1 (ZEB1) in human gastric cancer. *J. Surg. Oncol.* **106**, 280–285.
342. O'Mahony, A.M., Montano, M., Van Beneden, K., Chen, L.-F., and Greene, W.C. (2004). Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax induction of biologically Active NF-kappaB requires IkappaB kinase-1-mediated phosphorylation of RelA/p65. *J. Biol. Chem.* **279**, 18137–18145.
343. Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Res.* **68**, 3645–3654.

344. Ono, H., Imoto, I., Kozaki, K., Tsuda, H., Matsui, T., Kurasawa, Y., Muramatsu, T., Sugihara, K., and Inazawa, J. (2012). SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene* 31, 4923–4934.
345. Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264.
346. Park, S.-M., Gaur, A.B., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 22, 894–907.
347. Parsa, A.T., Waldron, J.S., Panner, A., Crane, C.A., Parney, I.F., Barry, J.J., Cachola, K.E., Murray, J.C., Tihan, T., Jensen, M.C., et al. (2007). Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat. Med.* 13, 84–88.
348. Péant, B., Diallo, J.-S., Dufour, F., Le Page, C., Delvoye, N., Saad, F., and Mes-Masson, A.-M. (2009). Over-expression of IkappaB-kinase-epsilon (IKKepsilon/IKKi) induces secretion of inflammatory cytokines in prostate cancer cell lines. *The Prostate* 69, 706–718.
349. Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 365–375.
350. Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2005a). Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 1749–1752.
351. Peinado, H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz, M., Olmeda, D., Csiszar, K., Fong, K.S.K., Vega, S., Nieto, M.A., Cano, A., and Portillo, F. (2005b). A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 24, 3446–3458.
352. Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415–428.
353. Peiró, S., Escrivà, M., Puig, I., Barberà, M.J., Dave, N., Herranz, N., Larriba, M.J., Takkunen, M., Francí, C., Muñoz, A., et al. (2006). Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res.* 34, 2077–2084.
354. Peña, C., García, J.M., Silva, J., García, V., Rodríguez, R., Alonso, I., Millán, I., Salas, C., de Herreros, A.G., Muñoz, A., et al. (2005). E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3361–3370.
355. Peña, C., García, J.M., García, V., Silva, J., Domínguez, G., Rodríguez, R., Maximiano, C., García de Herreros, A., Muñoz, A., and Bonilla, F. (2006). The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 119, 2098–2104.
356. Peralta Soler, A., Knudsen, K.A., Salazar, H., Han, A.C., and Keshgegian, A.A. (1999). P-cadherin expression in breast carcinoma indicates poor survival. *Cancer* 86, 1263–1272.
357. Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190–193.
358. Perrais, M., Chen, X., Perez-Moreno, M., and Gumbiner, B.M. (2007). E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions. *Mol. Biol. Cell* 18, 2013–2025.
359. Peters, R.T., Liao, S.M., and Maniatis, T. (2000). IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol. Cell* 5, 513–522.
360. Pinho, A.V., Rooman, I., and Real, F.X. (2011). p53-dependent regulation of growth,

- epithelial-mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells. *Cell Cycle* Georget. Tex 10, 1312–1321.
361. Polytarchou, C., Iliopoulos, D., and Struhl, K. (2012). An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14470–14475.
362. Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., and Ansieau, S. (2006). A twist for survival and cancer progression. *Br. J. Cancer* 94, 13–17.
363. Qin, B., and Cheng, K. (2010). Silencing of the IKK $\epsilon$  gene by siRNA inhibits invasiveness and growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res. BCR* 12, R74.
364. Qin, Q., Xu, Y., He, T., Qin, C., and Xu, J. (2012). Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Res.* 22, 90–106.
365. Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 267–296.
366. Radisky, D.C., and Bissell, M.J. (2007). NF- $\kappa$ B links oestrogen receptor signalling and EMT. *Nat. Cell Biol.* 9, 361–363.
367. Radisky, D.C., Kenny, P.A., and Bissell, M.J. (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J. Cell. Biochem.* 101, 830–839.
368. Rahman, A., Bando, M., Kefer, J., Anwar, K.N., and Malik, A.B. (1999). Protein kinase C-activated oxidant generation in endothelial cells signals intercellular adhesion molecule-1 gene transcription. *Mol. Pharmacol.* 55, 575–583.
369. Raimondi, G., Shufesky, W.J., Tokita, D., Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2006). Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 2808–2816.
370. Ranges, G.E., Figari, I.S., Espevik, T., and Palladino, M.A. (1987). Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 166, 991–998.
371. Rastaldi, M.P., Ferrario, F., Giardino, L., Dell'Antonio, G., Grillo, C., Grillo, P., Strutz, F., Müller, G.A., Colasanti, G., and D'Amico, G. (2002). Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* 62, 137–146.
372. Reibman, J., Meixler, S., Lee, T.C., Gold, L.I., Cronstein, B.N., Haines, K.A., Kolasinski, S.L., and Weissmann, G. (1991). Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6805–6809.
373. Reik, W., Dean, W., and Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089–1093.
374. Reilly, P.L., Woska, J.R., Jr, Jeanfavre, D.D., McNally, E., Rothlein, R., and Bormann, B.J. (1995). The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 529–532.
375. Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Manning, N.G., Abel, M.G., Wolf, D.M., and Horwitz, K.B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277, 5209–5218.
376. Roebuck, K.A., and Finnegan, A. (1999). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 66, 876–888.
377. Roland, C.L., Harken, A.H., Sarr, M.G., and Barnett, C.C., Jr (2007). ICAM-1 expression

- determines malignant potential of cancer. *Surgery* **141**, 705–707.
378. Romero, P., Dunbar, P.R., Valmori, D., Pittet, M., Ogg, G.S., Rimoldi, D., Chen, J.L., Liénard, D., Cerottini, J.C., and Cerundolo, V. (1998). Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**, 1641–1650.
379. Rosenstein, Y., Park, J.K., Hahn, W.C., Rosen, F.S., Bierer, B.E., and Burakoff, S.J. (1991). CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* **354**, 233–235.
380. Rosivatz, E., Becker, I., Specht, K., Fricke, E., Luber, B., Busch, R., Höfler, H., and Becker, K.-F. (2002). Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am. J. Pathol.* **161**, 1881–1891.
381. Roth, S.Y., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81–120.
382. Rothwarf, D.M., and Karin, M. (1999). The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **1999**, RE1.
383. Roy, H.K., Smyrk, T.C., Koetsier, J., Victor, T.A., and Wali, R.K. (2005). The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. *Dig. Dis. Sci.* **50**, 42–46.
384. Ru, P., Steele, R., Newhall, P., Phillips, N.J., Toth, K., and Ray, R.B. (2012). miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 1166–1173.
385. Sabin, R.J., and Anderson, R.M. (2011). Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr.* **2**, 7.
386. Sahlgren, C., Gustafsson, M.V., Jin, S., Poellinger, L., and Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6392–6397.
387. Saito, A., Suzuki, H.I., Horie, M., Ohshima, M., Morishita, Y., Abiko, Y., and Nagase, T. (2013). An integrated expression profiling reveals target genes of TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *PloS One* **8**, e56587.
388. Saito, T., Oda, Y., Kawaguchi, K., Sugimachi, K., Yamamoto, H., Tateishi, N., Tanaka, K., Matsuda, S., Iwamoto, Y., Ladanyi, M., et al. (2004). E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* **23**, 8629–8638.
389. Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* **207**, 2187–2194.
390. Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.-K., Beyer, T.A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A., and Wrana, J.L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* **7**, 64–77.
391. Sánchez-Tilló, E., Siles, L., de Barrios, O., Cuatrecasas, M., Vaquero, E.C., Castells, A., and Postigo, A. (2011a). Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 897–912.
392. Sánchez-Tilló, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., and Postigo, A.

- (2011b).  $\beta$ -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 19204–19209.
393. Sasai, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Inoue, N., Fujita, F., Nakanishi, M., and Seya, T. (2005). Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J. Immunol. Baltim. Md* **174**, 27–30.
394. Sasaki, K., Natsugoe, S., Ishigami, S., Matsumoto, M., Okumura, H., Setoyama, T., Uchikado, Y., Kita, Y., Tamotsu, K., Sakamoto, A., et al. (2009). Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **28**, 158.
395. Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., and Akira, S. (2003). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol. Baltim. Md* **171**, 4304–4310.
396. Sayan, A.E., Griffiths, T.R., Pal, R., Browne, G.J., Ruddick, A., Yagci, T., Edwards, R., Mayer, N.J., Qazi, H., Goyal, S., et al. (2009). SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14884–14889.
397. Scheel, C., and Weinberg, R.A. (2012). Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 396–403.
398. Scheel, C., Eaton, E.N., Li, S.H.-J., Chaffer, C.L., Reinhardt, F., Kah, K.-J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A.L., et al. (2011). Paracrine and Autocrine Signals Induce and Maintain Mesenchymal and Stem Cell States in the Breast. *Cell* **145**, 926–940.
399. Schickel, R., Park, S.-M., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2010). miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol. Cell* **38**, 908–915.
400. Schimmer, A.D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* **64**, 7183–7190.
401. Schneider, G., Henrich, A., Greiner, G., Wolf, V., Lovas, A., Wieczorek, M., Wagner, T., Reichardt, S., von Werder, A., Schmid, R.M., et al. (2010). Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53. *Oncogene* **29**, 2795–2806.
402. Schumm, K., Rocha, S., Caamano, J., and Perkins, N.D. (2006). Regulation of p53 tumour suppressor target gene expression by the p52 NF- $\kappa$ B subunit. *EMBO J.* **25**, 4820–4832.
403. Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278–287.
404. Selivanova, G., Kawasaki, T., Ryabchenko, L., and Wiman, K.G. (1998). Reactivation of mutant p53: a new strategy for cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 369–378.
405. Semb, H., and Christofori, G. (1998). The tumor-suppressor function of E-cadherin. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1588–1593.
406. Sengupta, S., and Harris, C.C. (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 44–55.
407. Servant, M.J., Clément, J.F., and Meloche, S. (2010). The IKK-related kinases, unsuspected culprits in oncogenesis?

408. Sethi, S., Macoska, J., Chen, W., and Sarkar, F.H. (2010). Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis. *Am. J. Transl. Res.* **3**, 90–99.
409. Sgarbanti, M., Marsili, G., Remoli, A.L., Stellacci, E., Mai, A., Rotili, D., Perrotti, E., Acciioni, C., Orsatti, R., Iraci, N., et al. (2014). I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  targets interferon regulatory factor 1 in activated T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1054–1065.
410. Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.-P., Lin, R., and Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148–1151.
411. Shen, R.R., and Hahn, W.C. (2011). Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene* **30**, 631–641.
412. Shen, R.R., Zhou, A.Y., Kim, E., Lim, E., Habelhah, H., and Hahn, W.C. (2012). I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  phosphorylates TRAF2 to promote mammary epithelial cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4756–4768.
413. Shetty, S., Graham, B.A., Brown, J.G., Hu, X., Vegh-Yarema, N., Harding, G., Paul, J.T., and Gibson, S.B. (2005). Transcription factor NF- $\kappa$ B differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5404–5416.
414. Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700.
415. Shi, L., Jackstadt, R., Siemens, H., Li, H., Kirchner, T., and Hermeking, H. (2014). p53-induced miR-15a/16-1 and AP4 form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res.* **74**, 532–542.
416. Shi, M., Xing, Y., Zhang, Z., Huang, J., and Chen, Y. (2013). [Effect of soluble PD-L1 released by lung cancer cells in regulating the function of T lymphocytes]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **35**, 85–88.
417. Shih, J.-Y., Tsai, M.-F., Chang, T.-H., Chang, Y.-L., Yuan, A., Yu, C.-J., Lin, S.-B., Liou, G.-Y., Lee, M.-L., Chen, J.J.W., et al. (2005). Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 8070–8078.
418. Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., and Akira, S. (1999). IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to I $\kappa$ B kinases. *Int. Immunol.* **11**, 1357–1362.
419. Shimono, Y., Zabala, M., Cho, R.W., Lobo, N., Dalerba, P., Qian, D., Diehn, M., Liu, H., Panula, S.P., Chiao, E., et al. (2009). Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* **138**, 592–603.
420. Shin, D.S., and Ribas, A. (2015). The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr. Opin. Immunol.* **33**, 23–35.
421. Shin, H.-M., Kim, M.-H., Kim, B.H., Jung, S.-H., Kim, Y.S., Park, H.J., Hong, J.T., Min, K.R., and Kim, Y. (2004). Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B without affecting I $\kappa$ B degradation. *FEBS Lett.* **571**, 50–54.
422. Shin, S., Dimitri, C.A., Yoon, S.-O., Dowdle, W., and Blenis, J. (2010). ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Mol. Cell* **38**, 114–127.
423. Shioiri, M., Shida, T., Koda, K., Oda, K., Seike, K., Nishimura, M., Takano, S., and

- Miyazaki, M. (2006). Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br. J. Cancer* **94**, 1816–1822.
424. Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Takahashi, M., Naito, S., and Kohno, K. (2008). Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction. *Oncogene* **27**, 5543–5553.
425. Shirakihara, T., Saitoh, M., and Miyazono, K. (2007). Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3533–3544.
426. Siegel, P.M., and Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 807–821.
427. Siemens, H., Jackstadt, R., Hünten, S., Kaller, M., Menssen, A., Götz, U., and Hermeking, H. (2011). miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle Georget. Tex* **10**, 4256–4271.
428. Singh, M., Spoelstra, N.S., Jean, A., Howe, E., Torkko, K.C., Clark, H.R., Darling, D.S., Shroyer, K.R., Horwitz, K.B., Broaddus, R.R., et al. (2008). ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **21**, 912–923.
429. Singh, S., Sadacharan, S., Su, S., Belldegrun, A., Persad, S., and Singh, G. (2003). Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Res.* **63**, 2306–2311.
430. Sivertsen, S., Hadar, R., Elloul, S., Vintman, L., Bedrossian, C., Reich, R., and Davidson, B. (2006). Expression of Snail, Slug and Sip1 in malignant mesothelioma effusions is associated with matrix metalloproteinase, but not with cadherin expression. *Lung Cancer Amst. Neth.* **54**, 309–317.
431. Skurk, C., Maatz, H., Kim, H.-S., Yang, J., Abid, M.R., Aird, W.C., and Walsh, K. (2004). The Akt-regulated Forkhead Transcription Factor FOXO3a Controls Endothelial Cell Viability through Modulation of the Caspase-8 Inhibitor FLIP. *J. Biol. Chem.* **279**, 1513–1525.
432. Smit, M.A., and Peepo, D.S. (2011). Zeb1 is required for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and metastasis. *Oncogene* **30**, 3735–3744.
433. Smyth, M.J., Teng, M.W.L., Swann, J., Kyriakis, K., Godfrey, D.I., and Hayakawa, Y. (2006). CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J. Immunol. Baltim. Md* **176**, 1582–1587.
434. Soini, Y., Tuhkanen, H., Sironen, R., Virtanen, I., Kataja, V., Auvinen, P., Mannermaa, A., and Kosma, V.-M. (2011). Transcription factors zeb1, twist and snai1 in breast carcinoma. *BMC Cancer* **11**, 73.
435. Song, L.-B., Liao, W.-T., Mai, H.-Q., Zhang, H.-Z., Zhang, L., Li, M.-Z., Hou, J.-H., Fu, L.-W., Huang, W.-L., Zeng, Y.-X., et al. (2006). The clinical significance of twist expression in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* **242**, 258–265.
436. Šošić, D., Richardson, J.A., Yu, K., Ornitz, D.M., and Olson, E.N. (2003). Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-κappaB activity. *Cell* **112**, 169–180.
437. Soulard, D., Bürckstümmer, T., Westermayer, S., Goncalves, A., Bauch, A., Stefanovic, A., Hantschel, O., Bennett, K.L., Decker, T., and Superti-Furga, G. (2008). The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. *EMBO J.* **27**, 2135–2146.

438. Soussi, T., and Béroud, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* *1*, 233–240.
439. Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hlubek, F., Berx, G., Eger, A., Merkel, S., Jung, A., Kirchner, T., and Brabletz, T. (2006). A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* *131*, 830–840.
440. Spoelstra, N.S., Manning, N.G., Higashi, Y., Darling, D., Singh, M., Shroyer, K.R., Broaddus, R.R., Horwitz, K.B., and Richer, J.K. (2006). The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers. *Cancer Res.* *66*, 3893–3902.
441. Stinson, S., Lackner, M.R., Adai, A.T., Yu, N., Kim, H.-J., O'Brien, C., Spoerke, J., Jhunjhunwala, S., Boyd, Z., Januario, T., et al. (2011). TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci. Signal.* *4*, ra41.
442. Stockinger, A., Eger, A., Wolf, J., Beug, H., and Foisner, R. (2001). E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J. Cell Biol.* *154*, 1185–1196.
443. Van de Stolpe, A., and van der Saag, P.T. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *74*, 13–33.
444. Stommel, J.M., and Wahl, G.M. (2005). A new twist in the feedback loop: stress-activated MDM2 destabilization is required for p53 activation. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 411–417.
445. Stover, D.G., Bierie, B., and Moses, H.L. (2007). A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. *J. Cell. Biochem.* *101*, 851–861.
446. Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R.L., Liu, J.Y., Bucay, N., Derynck, R., and Bleloch, R. (2011). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* *29*, 443–448.
447. Sugimachi, K., Tanaka, S., Kameyama, T., Taguchi, K., Aishima, S., Shimada, M., Sugimachi, K., and Tsuneyoshi, M. (2003). Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 2657–2664.
448. Sumual, S., Saad, S., Tang, O., Yong, R., McGinn, S., Chen, X.-M., and Pollock, C.A. (2010). Differential regulation of Snail by hypoxia and hyperglycemia in human proximal tubule cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 1689–1697.
449. Sun, C.-Y., She, X.-M., Qin, Y., Chu, Z.-B., Chen, L., Ai, L.-S., Zhang, L., and Hu, Y. (2013a). miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis* *34*, 426–435.
450. Sun, M., Song, L., Zhou, T., Gillespie, G.Y., and Jope, R.S. (2011). The role of DDX3 in regulating Snail. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 438–447.
451. Sun, M., Zhou, T., Jonasch, E., and Jope, R.S. (2013b). DDX3 regulates DNA damage-induced apoptosis and p53 stabilization. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 1489–1497.
452. Suzuki, M.M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 465–476.
453. Tam, W.L., and Weinberg, R.A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* *19*, 1438–1449.
454. Tamura, H., Dan, K., Tamada, K., Nakamura, K., Shioi, Y., Hyodo, H., Wang, S.-D., Dong, H., Chen, L., and Ogata, K. (2005). Expression of functional B7-H2 and B7.2 costimulatory molecules and their prognostic implications in de novo acute myeloid

- leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 5708–5717.
455. Tenoever, B.R., Ng, S.-L., Chua, M.A., McWhirter, S.M., García-Sastre, A., and Maniatis, T. (2007). Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science* **315**, 1274–1278.
456. Terauchi, M., Kajiyama, H., Yamashita, M., Kato, M., Tsukamoto, H., Umezawa, T., Hosono, S., Yamamoto, E., Shibata, K., Ino, K., et al. (2007). Possible involvement of TWIST in enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* **24**, 329–339.
457. Termén, S., Tan, E.-J., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2013). p53 regulates epithelial–mesenchymal transition induced by transforming growth factor  $\beta$ . *J. Cell. Physiol.* **228**, 801–813.
458. Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 442–454.
459. Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131–142.
460. Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890.
461. Thomas, D.A., and Massagué, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**, 369–380.
462. Thompson, R.H., Gillett, M.D., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Dong, H., Webster, W.S., Krejci, K.G., Lobo, J.R., Sengupta, S., Chen, L., et al. (2004). Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17174–17179.
463. Thompson, R.H., Kuntz, S.M., Leibovich, B.C., Dong, H., Lohse, C.M., Webster, W.S., Sengupta, S., Frank, I., Parker, A.S., Zincke, H., et al. (2006). Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* **66**, 3381–3385.
464. Thuault, S., Valcourt, U., Petersen, M., Manfioletti, G., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2006). Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **174**, 175–183.
465. Thuault, S., Tan, E.-J., Peinado, H., Cano, A., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2008). HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **283**, 33437–33446.
466. Tiwari, N., Tiwari, V.K., Waldmeier, L., Balwierz, P.J., Arnold, P., Pachkov, M., Meyer-Schaller, N., Schübeler, D., van Nimwegen, E., and Christofori, G. (2013). Sox4 Is a Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition by Controlling Ezh2 Expression and Epigenetic Reprogramming. *Cancer Cell* **23**, 768–783.
467. Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454.
468. Townsend, P.A., Scarabelli, T.M., Davidson, S.M., Knight, R.A., Latchman, D.S., and Stephanou, A. (2004). STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 5811–5820.
469. Tran, D.D., Corsa, C.A.S., Biswas, H., Aft, R.L., and Longmore, G.D. (2011). Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial-mesenchymal transition

- predicts for human breast cancer recurrence. *Mol. Cancer Res.* **MCR** *9*, 1644–1657.
470. Tsakadze, N.L., Sen, U., Zhao, Z., Sithu, S.D., English, W.R., and D’Souza, S.E. (2004). Signals mediating cleavage of intercellular adhesion molecule-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C55–C63.
471. Tseng, S.Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J.E., Pai, S.I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D.M., and Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* **193**, 839–846.
472. Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., et al. (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**, 45–53.
473. Valdés-Mora, F., Gómez del Pulgar, T., Bandrés, E., Cejas, P., Ramírez de Molina, A., Pérez-Palacios, R., Gallego-Ortega, D., García-Cabezas, M.A., Casado, E., Larrauri, J., et al. (2009). TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **16**, 78–87.
474. Vance, J.E., and Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog. Lipid Res.* **44**, 207–234.
475. Vandewalle, C., Comijn, J., De Craene, B., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Van Roy, F., and Berx, G. (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6566–6578.
476. Vassilev, L.T. (2005). p53 Activation by small molecules: application in oncology. *J. Med. Chem.* **48**, 4491–4499.
477. Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844–848.
478. Velikova, G., Banks, R.E., Gearing, A., Hemingway, I., Forbes, M.A., Preston, S.R., Jones, M., Wyatt, J., Miller, K., Ward, U., et al. (1997). Circulating soluble adhesion molecules E-cadherin, E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in patients with gastric cancer. *Br. J. Cancer* **76**, 1398–1404.
479. Verhelst, K., Verstrepen, L., Carpentier, I., and Beyaert, R. (2013). IKK kinase ε (IKKε): a therapeutic target in inflammation and cancer. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 873–880.
480. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* **84**, 627–639.
481. Vernon, A.E., and LaBonne, C. (2006). Slug stability is dynamically regulated during neural crest development by the F-box protein Ppa. *Dev. Camb. Engl.* **133**, 3359–3370.
482. Villagrasa, P., Díaz, V.M., Viñas-Castells, R., Peiró, S., Del Valle-Pérez, B., Dave, N., Rodríguez-Asiaín, A., Casal, J.I., Lizcano, J.M., Duñach, M., et al. (2012). Akt2 interacts with Snail1 in the E-cadherin promoter. *Oncogene* **31**, 4022–4033.
483. Viñas-Castells, R., Beltran, M., Valls, G., Gómez, I., García, J.M., Montserrat-Sentís, B., Baulida, J., Bonilla, F., de Herreros, A.G., and Díaz, V.M. (2010). The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation. *J. Biol. Chem.* **285**, 3794–3805.
484. Vincent, T., Neve, E.P.A., Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., et al. (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* **11**, 943–950.

485. Wan, L., Pantel, K., and Kang, Y. (2013). Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat. Med.* **19**, 1450–1464.
486. Wang, W., and El-Deiry, W.S. (2008). Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr. Opin. Oncol.* **20**, 90–96.
487. Wang, B.-J., Bao, J.-J., Wang, J.-Z., Wang, Y., Jiang, M., Xing, M.-Y., Zhang, W.-G., Qi, J.-Y., Roggendorf, M., Lu, M.-J., et al. (2011a). Immunostaining of PD-1/PD-Ls in liver tissues of patients with hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* **17**, 3322–3329.
488. Wang, D.-M., Liu, L., Fan, L., Zou, Z.-J., Zhang, L.-N., Yang, S., Li, J.-Y., and Xu, W. (2012). Expression level of DEK in chronic lymphocytic leukemia is regulated by fludarabine and Nutlin-3 depending on p53 status. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 1522–1528.
489. Wang, F.E., Zhang, C., Maminishkis, A., Dong, L., Zhi, C., Li, R., Zhao, J., Majerciak, V., Gaur, A.B., Chen, S., et al. (2010). MicroRNA-204/211 alters epithelial physiology. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 1552–1571.
490. Wang, N., Ahmed, S., and Haqqi, T.M. (2005). Genomic structure and functional characterization of the promoter region of human I $\kappa$ B kinase-related kinase IKK $\kappa$ /IKK $\epsilon$  gene. *Gene* **353**, 118–133.
491. Wang, S.-F., Fouquet, S., Chapon, M., Salmon, H., Regnier, F., Labroquère, K., Badoual, C., Damotte, D., Validire, P., Maubec, E., et al. (2011b). Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors. *PloS One* **6**, e17621.
492. Wang, S.-P., Wang, W.-L., Chang, Y.-L., Wu, C.-T., Chao, Y.-C., Kao, S.-H., Yuan, A., Lin, C.-W., Yang, S.-C., Chan, W.-K., et al. (2009a). p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat. Cell Biol.* **11**, 694–704.
493. Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A.S., Ali, S., Abbruzzese, J.L., Gallick, G.E., and Sarkar, F.H. (2009b). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res.* **69**, 2400–2407.
494. Wang, Z., Jiang, Y., Guan, D., Li, J., Yin, H., Pan, Y., Xie, D., and Chen, Y. (2013). Critical roles of p53 in epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *PloS One* **8**, e72846.
495. Weinberg, R.A. (2008). Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1021–1023.
496. Weinstein, I.B. (2000). Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* **21**, 857–864.
497. Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., et al. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1487–1495.
498. Wels, C., Joshi, S., Koefinger, P., Bergler, H., and Schaider, H. (2011). Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1877–1885.
499. Wietek, C., Cleaver, C.S., Ludbrook, V., Wilde, J., White, J., Bell, D.J., Lee, M., Dickson, M., Ray, K.P., and O'Neill, L.A.J. (2006). I $\kappa$ B Kinase  $\epsilon$  Interacts with p52 and Promotes Transactivation via p65. *J. Biol. Chem.* **281**, 34973–34981.
500. Wilcox, R.A., Feldman, A.L., Wada, D.A., Yang, Z.-Z., Comfere, N.I., Dong, H., Kwon, E.D., Novak, A.J., Markovic, S.N., Pittelkow, M.R., et al. (2009). B7-H1 (PD-L1, CD274)

- suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood* **114**, 2149–2158.
501. Wintterle, S., Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L., Meyermann, R., Weller, M., and Wiendl, H. (2003). Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res.* **63**, 7462–7467.
502. Witkowska, A.M., and Borawska, M.H. (2004). Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur. Cytokine Netw.* **15**, 91–98.
503. Wojtowicz-Praga, S. (2003). Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF-beta inhibitors. *Invest. New Drugs* **21**, 21–32.
504. Woo, S.-R., Turnis, M.E., Goldberg, M.V., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C.J., Bettini, M.L., Gravano, D.M., Vogel, P., Liu, C.L., et al. (2012). Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* **72**, 917–927.
505. Wrzesinski, S.H., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 5262–5270.
506. Wu, M.Y., and Hill, C.S. (2009). Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev. Cell* **16**, 329–343.
507. Wu, C., Zhu, Y., Jiang, J., Zhao, J., Zhang, X.-G., and Xu, N. (2006). Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem.* **108**, 19–24.
508. Wu, K., Zeng, J., Zhu, G., Zhang, L., Zhang, D., Li, L., Fan, J., Wang, X., and He, D. (2009a). Silibinin inhibits prostate cancer invasion, motility and migration by suppressing vimentin and MMP-2 expression. *Acta Pharmacol. Sin.* **30**, 1162–1168.
509. Wu, Q., Guo, R., Lin, M., Zhou, B., and Wang, Y. (2011). MicroRNA-200a inhibits CD133/1+ ovarian cancer stem cells migration and invasion by targeting E-cadherin repressor ZEB2. *Gynecol. Oncol.* **122**, 149–154.
510. Wu, Y., Deng, J., Rychahou, P.G., Qiu, S., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2009b). Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* **15**, 416–428.
511. Xerri, L., Chetaille, B., Serriari, N., Serriari, N., Attias, C., Guillaume, Y., Arnoulet, C., and Olive, D. (2008). Programmed death 1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Hum. Pathol.* **39**, 1050–1058.
512. Xiong, H., Hong, J., Du, W., Lin, Y., Ren, L., Wang, Y., Su, W., Wang, J., Cui, Y., Wang, Z., et al. (2012). Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **287**, 5819–5832.
513. Xu, G., Lo, Y.-C., Li, Q., Napolitano, G., Wu, X., Jiang, X., Dreano, M., Karin, M., and Wu, H. (2011). Crystal structure of inhibitor of kB kinase β. *Nature* **472**, 325–330.
514. Xu, J., Lamouille, S., and Deryck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156–172.
515. Xu, X., Fu, X.Y., Plate, J., and Chong, A.S. (1998). IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res.* **58**, 2832–2837.
516. Xu, Y., Lee, S.-H., Kim, H.S., Kim, N.H., Piao, S., Park, S.-H., Jung, Y.S., Yook, J.I., Park, B.-J., and Ha, N.-C. (2010). Role of CK1 in GSK3beta-mediated phosphorylation and

- degradation of snail. *Oncogene* 29, 3124–3133.
517. Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., and Israël, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93, 1231–1240.
518. Yamauchi, Y., Kohyama, T., Takizawa, H., Kamitani, S., Desaki, M., Takami, K., Kawasaki, S., Kato, J., and Nagase, T. (2010). Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1. *Exp. Lung Res.* 36, 12–24.
519. Yan, X., Liu, Z., and Chen, Y. (2009). Regulation of TGF- $\beta$  signaling by Smad7. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 41, 263–272.
520. Yanagawa, J., Walser, T.C., Zhu, L.X., Hong, L., Fishbein, M.C., Mah, V., Chia, D., Goodlick, L., Elashoff, D.A., Luo, J., et al. (2009). Snail promotes CXCR2 ligand-dependent tumor progression in non-small cell lung carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 6820–6829.
521. Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., et al. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398, 714–718.
522. Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., et al. (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404, 99–103.
523. Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.
524. Yang, J., Riella, L.V., Chock, S., Liu, T., Zhao, X., Yuan, X., Paterson, A.M., Watanabe, T., Vanguri, V., Yagita, H., et al. (2011). The novel costimulatory programmed death ligand 1/B7.1 pathway is functional in inhibiting alloimmune responses in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 187, 1113–1119.
525. Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A.E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D.P., Matrisian, L.M., Richmond, A., Lin, P.C., et al. (2008a). Abrogation of TGF $\beta$  Signaling in Mammary Carcinomas Recruits Gr-1+CD11b+ Myeloid Cells that Promote Metastasis. *Cancer Cell* 13, 23–35.
526. Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., and Wu, K.-J. (2008b). Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat. Cell Biol.* 10, 295–305.
527. Yang, M.-H., Chen, C.-L., Chau, G.-Y., Chiou, S.-H., Su, C.-W., Chou, T.-Y., Peng, W.-L., and Wu, J.-C. (2009). Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* 50, 1464–1474.
528. Yan-Qi, Z., Xue-Yan, G., Shuang, H., Yu, C., Fu-Lin, G., Fei-Hu, B., Shi-Ren, S., Xu-Feng, W., Jie, D., and Dai-Ming, F. (2007). Expression and significance of TWIST basic helix-loop-helix protein over-expression in gastric cancer. *Pathology (Phila.)* 39, 470–475.
529. Yao, Y., Bellon, M., Shelton, S.N., and Nicot, C. (2012). Tumor Suppressors p53, p63TA $\alpha$ , p63TA $\gamma$ , p73 $\alpha$ , and p73 $\beta$  Use Distinct Pathways to Repress Telomerase Expression. *J. Biol. Chem.* 287, 20737–20747.
530. Yingling, J.M., Blanchard, K.L., and Sawyer, J.S. (2004). Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 1011–1022.

531. Yoshida, H., Jono, H., Kai, H., and Li, J.-D. (2005). The Tumor Suppressor Cylindromatosis (CYLD) Acts as a Negative Regulator for Toll-like Receptor 2 Signaling via Negative Cross-talk with TRAF6 and TRAF7. *J. Biol. Chem.* **280**, 41111–41121.
532. Yu, J., and Zhang, L. (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 851–858.
533. Yuen, H.-F., Chua, C.-W., Chan, Y.-P., Wong, Y.-C., Wang, X., and Chan, K.-W. (2007). Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology* **50**, 648–658.
534. Zaika, A.I., Kovalev, S., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (1999). Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res.* **59**, 3257–3263.
535. Zamarron, B.F., and Chen, W. (2011). Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 651–658.
536. Zandi, E., and Karin, M. (1999). Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4547–4551.
537. Zeisberg, M., and Neilson, E.G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* **119**, 1429–1437.
538. Zeng, Z., Shi, F., Zhou, L., Zhang, M.-N., Chen, Y., Chang, X.-J., Lu, Y.-Y., Bai, W.-L., Qu, J.-H., Wang, C.-P., et al. (2011). Upregulation of circulating PD-L1/PD-1 is associated with poor post-cryoablation prognosis in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. *PloS One* **6**, e23621.
539. Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**, 2343–2360.
540. Zhang, J., Stirling, B., Temmerman, S.T., Ma, C.A., Fuss, I.J., Derry, J.M.J., and Jain, A. (2006). Impaired regulation of NF-kappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **116**, 3042–3049.
541. Zhang, J., Liang, Q., Lei, Y., Yao, M., Li, L., Gao, X., Feng, J., Zhang, Y., Gao, H., Liu, D.-X., et al. (2012a). SOX4 induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression. *Cancer Res.* **72**, 4597–4608.
542. Zhang, J., Zhang, H., Liu, J., Tu, X., Zang, Y., Zhu, J., Chen, J., Dong, L., and Zhang, J. (2012b). miR-30 inhibits TGF-β1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 1100–1105.
543. Zhang, X., Fournier, M.V., Ware, J.L., Bissell, M.J., Yacoub, A., and Zehner, Z.E. (2009). Inhibition of vimentin or beta1 integrin reverts morphology of prostate tumor cells grown in laminin-rich extracellular matrix gels and reduces tumor growth in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 499–508.
544. Zhang, Y., Yan, W., and Chen, X. (2013). Mutant p53 cooperates with knockdown of endogenous wild-type p53 to disrupt tubulogenesis in Madin-Darby canine kidney cells. *PloS One* **8**, e85624.
545. Zhang, Z., Xie, D., Li, X., Wong, Y.-C., Xin, D., Guan, X.-Y., Chua, C.W., Leung, S.C.L., Na, Y., and Wang, X. (2007). Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum. Pathol.* **38**, 598–606.
546. Zhang, Z., Zhang, B., Li, W., Fu, L., Fu, L., Zhu, Z., and Dong, J.-T. (2011). Epigenetic Silencing of miR-203 Upregulates SNAI2 and Contributes to the Invasiveness of Malignant Breast Cancer Cells. *Genes Cancer* **2**, 782–791.

547. Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., and Ghosh, S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* 9, 625–636.
548. Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.-C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 6, 931–940.
549. Zhou, Y.-M., Cao, L., Li, B., Zhang, R.-X., Sui, C.-J., Yin, Z.-F., and Yang, J.-M. (2012). Clinicopathological significance of ZEB1 protein in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 19, 1700–1706.
550. Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khouri, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 6, 1245–1252.
551. Zhu, Z., Aref, A.R., Cohoon, T.J., Barbie, T.U., Imamura, Y., Yang, S., Moody, S.E., Shen, R.R., Schinzel, A.C., Thai, T.C., et al. (2014). Inhibition of KRAS-driven tumorigenicity by interruption of an autocrine cytokine circuit. *Cancer Discov.*
552. Zou, W., and Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 467–477.

# LES LIENS

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IKBKE>

[http://swissmodel.expasy.org/repository/?pid=smr03&mid=md7cb57dfd70769758593c4ff8882c5dd\\_s2\\_e307\\_t4euu](http://swissmodel.expasy.org/repository/?pid=smr03&mid=md7cb57dfd70769758593c4ff8882c5dd_s2_e307_t4euu)