

# Etude du rôle des fibroblastes associés au mélanome dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale: influence de la sécrétion de métalloprotéinases matricielles sur la lyse tumorale dépendante des cellules NK et de l'hypoxie sur leur potentiel immunosuppresseur

Linda Ziani

## ▶ To cite this version:

Linda Ziani. Etude du rôle des fibroblastes associés au mélanome dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale : influence de la sécrétion de métalloprotéinases matricielles sur la lyse tumorale dépendante des cellules NK et de l'hypoxie sur leur potentiel immunosuppresseur. Immunologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS114 . tel-01540384

## HAL Id: tel-01540384 https://theses.hal.science/tel-01540384

Submitted on 16 Jun2017

**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.





NNT: 2017SACLS114

# THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 582 CBMS Cancérologie : biologie - médecine - santé

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

# M<sup>elle</sup> Linda ZIANI

Etude du rôle des fibroblastes associés au mélanome dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale : influence de la sécrétion de métalloprotéinases matricielles sur la lyse tumorale dépendante des cellules NK et de l'hypoxie sur leur potentiel immunosuppresseur

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 02 Juin 2017

**Composition du Jury :** 

Pr. Eric SolaryGustave RoussyPr. Claudine KiedaCentre de Biophysique MoléculaireDr. Cédric GaggioliInstitut de Recherche sur le Cancer et le VieillissementPr. Eric TartourHôpital Européen Georges-PompidouDr. Nicolas DumazHôpital Saint-LouisDr. Jérôme ThieryGustave Roussy

Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Directeur de thèse



**Titre :** Etude du rôle des fibroblastes associés au mélanome dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale : influence de la sécrétion de métalloprotéinases matricielles sur la lyse tumorale dépendante des cellules NK et de l'hypoxie sur leur potentiel immunosuppresseur

**Mots clés :** fibroblastes associés au cancer, cellules natural killer, métalloprotéinases matricielles, MICA/B, mélanome, hypoxie.

Résumé : Les fibroblastes associés au cancer (CAF) jouent un rôle central dans un processus complexe d'interaction entre les tumeurs et le stroma et favorisent la croissance tumorale. Des preuves émergentes suggèrent que ces fibroblastes sont impliqués dans l'altération de la réponse immune anti-tumorale. Cependant, les mécanismes immuno-modulateurs sous-jacents dépendants de ces fibroblastes ne sont encore que très partiellement définis. Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence que les fibroblastes associés au mélanome diminuent la susceptibilité des cellules tumorales de mélanome à la lyse induite par les cellules Natural killer (NK) par un mécanisme dépendant de la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMPs) actives. Cette sécrétion de MMPs réduit l'expression de deux ligands du récepteur activateur NKG2D, MICA/B, à la surface des cellules tumorales et diminue par conséquent l'activité cytotoxique des cellules NK dépendante de NKG2D contre les cellules tumorales de mélanome. D'autre part, grâce à une approche génomique globale, mon travail a montré que l'hypoxie au sein du stroma tumoral pourrait augmenter les capacités immuno-modulatrices des CAFs en modifiant l'expression d'un ensemble de gènes qui codent pour des protéines immunosuppressives. L'ensemble de ces résultats démontrent donc que les CAFs sont des déterminants essentiels modifiant la susceptibilité des cellules tumorales aux cellules tueuses mais qu'il existerait également un dialogue entre le microenvironnement hypoxique et les CAFs leur permettant d'augmenter leur potentiel immunosuppresseur.

**Title :** Role of melanoma-associated fibroblasts in the modulation of anti-tumor immune response: influence of matrix metalloproteinases secretion on NK cell-dependent tumor lysis and hypoxia on their immunosuppressive potential

**Keywords :** cancer-associated fibroblasts, natural killer cells, matrix-metalloproteinases, MICA/B, melanoma, hypoxia.

**Abstract :** Cancer-associated fibroblasts (CAF) play a central role in a complex process of interaction between tumors and stroma and promote tumor growth. Emerging evidence suggest that these fibroblasts are involved in the alteration of the anti-tumor immune response. However, the underlying immunomodulatory mechanisms dependent on these fibroblasts are still only partially defined. During my thesis, I demonstrated that melanoma-associated fibroblasts decrease the susceptibility of melanoma tumor cells to Natural killer (NK) cell lysis through a mechanism dependent on the secretion of active matrix metalloproteinases (MMPs). This secretion of MMPs reduces the expression of the two NKG2D ligands, MICA/B at the surface of the tumor cells and consequently decreases the NKG2D-dependent cytotoxic activity of NK cells against melanoma tumor cells. On the other hand, using a global genomic approach, my results suggested that hypoxia within the tumor stroma could increase the immunomodulatory capacities of CAFs by modifying the expression of a set of genes that encode for immunosuppressive proteins. Together, our results show that CAFs are essential determinants modifying the susceptibility of tumor cells to killer cells but that there is also a crosstalk between the hypoxic microenvironment and the CAFs allowing them to increase their immunosuppressive potential.

Se dédie cette thèse

A mon très cher père « Nasser Ziani », sans doute, le meilleur papa au monde Tu as toujours été mon héro et je n'ai manqué de rien à tes côtés

A ma très chère mère « Saliha Ziani », mon exemple et mon repère Tu incarnes la beauté de ce monde à mes yeux

Pour mes parents qui ont toujours répondu présents et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Ce travail est le fruit de la rigueur de l'éducation qu'ils m'ont prodigué; avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard. Il représente l'aboutissement du soutien inestimable et des encouragements incontestables qu'ils m'ont apportés tout au long de ma scolarité et pendant ce périple qu'est la thèse. Pour leur tendresse inébranlable et le sens du devoir qu'ils ont veillé à m'enseigner depuis mon enfance et qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter et m'avez donné « des racines et des ailes ». J'espère que vous trouverez dans ce modeste travail le témoignage de toute ma reconnaissance et de tout l'amour sans pareil qu'aucun mot ne saurait exprimer.

Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.

Je vous aime...

Remerciements

J'exprime ma sincère reconnaissance à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail

*Je remercie sincèrement le Pr. Eric Solary de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse* 

Je remercie sincèrement le Pr. Claudine Kieda et le Dr. Cédric Gaggioli pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à la lecture et à l'évaluation de mon manuscrit et de mes travaux

Je remercie infiniment le Pr. Eric Tartour et le Dr. Nicolas Dumaz qui m'ont fait l'honneur de participer au jury de soutenance en qualité d'examinateurs

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, Dr. Jérôme Thiery sans lequel cette thèse n'aurait pas eu lieu. Ta porte a toujours été ouverte, je te remercie de m'avoir guidée et permis d'acquérir une autonomie dans mon travail de recherche. Ton aide a été d'un apport précieux et indispensable. Je tiens à te remercier du temps que tu as consacré à m'orienter tout au long de la réalisation de cette thèse et pour ta générosité et ta grande patience. Ta persévérance dans le suivi m'a permis de mener à bien cette thèse. Je tiens à te remercier également pour la somme des conseils et des encouragements dans les moments clés de l'élaboration de ce travail. Enfin, Je te remercie pour tout ce que tu m'as apportée scientifiquement et je te témoigne ici, l'expression de ma vive reconnaissance

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Salem Chouaib pour m'avoir accueillie au sein de son unité. Je souhaite vous remercier pour avoir mis à disposition tous les moyens nécessaires à la concrétisation de ce travail et pour vos remarques pertinentes, votre disponibilité malgré les charges professionnelles et votre aide chaque fois qu'elle ait été sollicitée durant toute cette thèse

Je remercie le Dr. Fathia Mami-Chouaib pour son accueil au sein du laboratoire et pour ses encouragements

Je remercie le Pr. Jean Paul Thiery et le Dr. Jean-henri Bourhis pour le savoir qu'ils partagent si généreusement

Je remercie le Pr. Gilles Favre et le Dr. Julia Cherier de l'Institut Claudius Regaud-Toulouse pour leurs conseils scientifiques

Au delà des expériences scientifiques que comporte une thèse, l'expérience humaine est incontournable. Durant ces trois ans et demi de thèse, j'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable et une atmosphère mi-sérieuse mi-bon enfant que l'ensemble des membres de l'équipe ont créé et de ce fait, je souhaite remercier :

Thouraya Ben Safta-Saadoune, ma partenaire de bureau, de salle de culture et de paillasse durant toutes ces années. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée durant cette thèse et pour ta volonté de fer. En témoignage de ma grande affection et en souvenir des agréables moments inoubliables passés ensemble et de nos innombrables fous rires, je te remercie pour ta grande amitié et ta gentillesse. Ce fut une joie de travailler à tes côtés et la vie au laboratoire n'aurait pas été la même sans toi. Voilà on y est!

Dr. Zaeem Noman, je te remercie pour tes conseils, ton soutien et pour toutes les discussions diverses et variées. Merci pour les ondes positives que tu apportes. Tu es une rencontre exceptionnelle et inoubliable sur le plan amical et indéniablement sur le plan scientifique!

Dr. Meriem Hasmim, je te remercie pour ton aide, ta disponibilité et tes conseils durant ces années. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur quotidienne, j'ai apprécié chaque moment passé en ta compagnie et je n'en garderai que de bons souvenirs!

Dr. Stephane Terry, nous avons partagé le même bureau et qui dit bureau, dit heures tardives à discuter de SCIENCE! Ta curiosité scientifique m'épate (ça doit être les carottes). Tu es vraiment un bon ami et un bon chercheur! Je te remercie pour tout ce que tu as pu m'apporter humainement et scientifiquement

Dr. Mehdi Khaled, je tiens à te remercier pour ton aide, tes idées enrichissantes et tes généreux conseils durant ces années. Merci également pour ton œil critique, ton ouverture à la discussion et ta modestie scientifique

Je souhaite remercier chaleureusement Christine Leroy pour sa disponibilité, son aide et sa gentillesse durant toute cette thèse. Je te remercie également pour ta constante bonne humeur et ta grande générosité

Stéphanie Buart, je te remercie pour ta gentillesse, ta sympathie et toute l'aide précieuse que tu m'as apportée au laboratoire. Je te remercie aussi pour ta présence, ta générosité et pour tous les moments que nous avons partagés durant ces années

Merci au Dr. Stéphanie Corgnac pour ton aide, ta sympathie et ta gaieté d'esprit. Nul doute qu'une belle et longue carrière t'attend dans la recherche

Les Super Girls: Ludiane, Marine, Ines et Aurélie nous avons partagé beaucoup de belles choses (et d'anticorps)! Merci pour votre bonne humeur contagieuse et la bonne ambiance que vous créez en toutes circonstances!

Abdou Abdérémane, merci pour ta gentillesse, ton aide et ta patience, je te souhaite que du bonheur!

Yasemin (and, that german accent!) je te remercie pour les bons moments que nous avons partagés. Certes, nous avons beaucoup stressé mais dans ces moments, nous avons aussi beaucoup ri. Merci aussi pour tous nos grands débats de cantine que je qualifierai de très intéressants (ou pas)!

Aux belles rencontres que mon chemin a croisé, aux Docteurs.: M'barka, Yosra, Fayçal, Marie. B, Intissar, Sanam, Benoît, Andrès, Pedro et Nadine. J'ai appris de chacun de vous. Un grand merci à vous tous

Gwendoline, merci pour la touche espiègle que tu apportes et pour ta « positive attitude »

Je remercie les Drs. Sophie Gad et Sophie Couvé pour leur aide quand besoin est, et je souhaite bonne chance à Florine pour sa thèse et à Vinodh pour son post-doc

Merci au Dr.Arash Nanbakhsh pour son aide et sa compagnie pendant les Week-ends au labo

Un grand merci à Arlette Garcia qui m'a initiée aux cultures primaires de ces « Fibro-boys!»

Merci à toi Johanne, pour ton aide, ton dynamisme et ta volonté

Merci à Laetitia, Alice et Camille pour votre sympathie (et pour le lecteur de plaque que vous avez si généreusement partagé avec moi)

Merci au Dr. Siham Bibi pour ton soutien moral et ton amitié. Tu fais partie des belles rencontres que j'ai faites, je te souhaite tout le meilleur dans ta vie

Merci à ma voisine de palier de laboratoire, Dr. Anamarija Jurišić pour tous ces bons moments partagés. Je me souviens encore de la première fois que je t'ai vue, j'ai tout de suite su qu'on allait bien s'entendre! Je te souhaite bon courage pour ton nouveau post-doc

A tous les nouveaux arrivants dans l'équipe, je vous souhaite une bonne chance pour la suite

Je tiens à remercier le Dr. Caroline Robert, le Dr. Andrea Cavalcanti et Nyam Kamsu-Kom pour toutes les biopsies de patients qu'ils ont pu nous procurer. Merci à tous ces patients pour leur consentement

Je remercie le Dr. Guillaume Meurice pour sa disponibilité et son aide pour les analyses bioinformatiques

Je remercie Olivia Bawa pour m'avoir si gentiment aidée et apportée son expertise en immunohistochimie

Un grand merci aux Drs. Aicha Ben Lakhdar et Sophie Ferlicot pour leur généreuse collaboration pour la lecture des lames

Merci à Yann Lecluse pour m'avoir appris les bases de la cytométrie en flux

Je tiens à remercier Mme Cyrille Brigitte et Mme Nadia Iafrate pour leur aide dans toutes les démarches administratives

Je voudrais également remercier la ligue Nationale Contre le Cancer pour le soutien financier pendant ces trois années. Une pensée va aussi à tous les généreux donateurs

Je remercie la contribution de la direction de Gustave Roussy pour la Taxe d'apprentissage

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Anissa Bouhadef de l'Institut Pasteur pour m'avoir encouragée à suivre cette voie durant ma première expérience de laboratoire

Je remercie les personnes du Département de Recherche Translationnelle du cancer du sein de l'Institut Curie, en particulier le Dr. Thierry Dubois et le Dr. Sylvie Maubant, qui m'ont initiée à la recherche au cours de mon master Mes chers parents, pour leurs encouragements incessants durant toutes ces années. Je vous remercie profondément pour votre accompagnement, votre amour et votre soutien indéfectible sans lequel je n'en serai pas là aujourd'hui. Je vous dois tant et j'espère pouvoir vous rendre un jour tout ce que vous m'avez apporté

#### Mon adorable sœur, Yasmine

Pour ton optimisme, ton soutien inconditionnel et ta présence continue à toutes épreuves et pour avoir été à mon écoute durant toute cette thèse. Je te souhaite tout le bonheur du monde et beaucoup de succès dans ta vie, tu le mérites amplement. T'es juste la meilleure!

Mes aimables frères Khadir, Ferhat, Ryan et Riad, pour leurs encouragements. Merci à toi Khadir pour avoir été à mes côtés au moindre coup de fil, ta présence m'a beaucoup aidée et j'ai pu compter sur toi à maintes reprises. Merci mille fois, je te souhaite beaucoup de réussite dans tout ce que tu entreprendras

Mes copines proches Maha et Mayssa, merci pour votre soutien en dépit de la distance et pour ces longues belles années qui nous lient

Mes remerciements vont également à ma famille et mes amis d'Algérie et de France ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail et que j'ai omis de citer "Une mer calme n'a jamais fait un bon marin"

Franklin D. Roosevelt

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES TABLES	7
LISTE DES ABBREVIATIONS	8
AVANT-PROPOS	11
INTRODUCTION	12
I. Le mélanome	13
1. Généralités	13
2. Le développement du mélanome	14
2.1. Généralités	14
2.2. Physiopathologie moléculaire	14
2.3. La vie d'une métastase de mélanome	15
3. Les traitements	16
3.1. La chirurgie	17
3.2. La chimiothérapie	17
3.3. La radiothérapie	18
3.4. Les thérapies ciblées	18
3.5. L'immunothérapie	18
3.5.1. Généralités	18
3.5.2. Les anticorps monoclonaux anti-CTLA-4	20
3.5.3. Les anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1	21
II. La réponse immune anti-tumorale	22
1. Le concept d'immunosurveillance	
2. Déroulement de la réponse immunitaire : généralités	
2.1. Les cellules dendritiques	24
2.2. Les lymphocytes T	
2.2.1. Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup>	27
2.2.2. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8 <sup>+</sup> : les effecteurs clés de la réponse imm	mune anti-
tumorale	
2.3. Les cellules tueuses naturelles (Natural Killer ; NK)	29
2.3.1. Historique	

2.3.2. Définition	29
2.3.3. Développement et différenciation des cellules NK	
2.3.4. Education des cellules NK: la tolérance du soi	
2.3.5. Activation des cellules NK	
2.3.5.1. Les récepteurs activateurs	34
1. Le récepteur NKG2D (Natural-Killer Group2, member D)	
a) Structure, signalisation, et rôle de NKG2D dans l'immunité antitumorale	
b) Les ligands de NKG2D	35
2. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCRs)	
3. Le récepteur DNAM-1	
4. Le récepteur CD16	
5. Les KIR activateurs	
2.3.5.2. Les récepteurs inhibiteurs	
1. Les récepteurs KIR inhibiteurs	
2. Les récepteurs apparentés aux lectines de type C: récepteurs CD94/NKG2	
2.3.6. Les cytokines et les chimiokines secrétées par les cellules NK	40
2.3.7. Implication des cellules NK dans la réponse immunitaire dirigée contre le	e mélanome40
2.3.8. L'immunothérapie basée sur les cellules NK	41
2.3.8.1. Les cellules NK autologues	41
2.3.8.2. Les cellules NK allogéniques	42
2.3.8.3. Les lignées de cellules NK	42
2.4. Mécanismes de cytotoxicité des effecteurs cytotoxiques	43
2.4.1. La voie perforine/granzymes	
2.4.2. La voie des récepteurs à domaine de mort	46
III. Echappement à l'immunosurveillance	47
1. La théorie de l'immunoediting: les trois E	48
2. Les mécanismes d'échappement immunitaire	50
2.1. Echappement à la reconnaissance et anergie	50
2.2. Perte d'expression des molécules d'adhésion	51
2.3. Baisse d'expression des ligands activateurs des NK	51
2.4. Augmentation d'expression des ligands inhibiteurs des NK	51
2.5. Résistance à la voie perforine/granzymes et aux récepteurs à domaine	e de mort52
2.6. Expression de facteurs immunosuppresseurs	53
2.7. Recrutement dans le microenvironnement de cellules immunosuppres	ssives54
	2

2.7.1.	Les lymphocytes T régulateurs (Treg)	54
2.7.2.	Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs)	55
2.7.3.	Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)	55

57
57
58
59
59
60
60
62
63
63
64
65
65
65
66
67
67
67
68
68
69
70
72
72
73
73
74
76
77
78
78

5.3.	Rôle des CAFs dans le métabolisme des cellules tumorales	79
5.4.	Rôle des CAFs dans l'angiogenèse	80
5.5.	Rôle des CAFs dans le processus métastatique	80
5.6.	Rôle des CAFs dans la résistance aux thérapies	82
5.7.	Rôle des CAFs dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale	83
5.7.1.	Les CAFs et la réponse immune innée	83
5.7.2.	Les CAFs et la réponse immune adaptative	85

V.	L'hypoxie tumorale	87
1.	Définition	87
2.	Les facteurs inductibles par l'hypoxie, HIFs	89
•	Le facteur de transcription HIF-1	90
3.	Hypoxie et cancer	91
4.	Hypoxie et mélanome	92
5.	Effet du stress hypoxique sur la réponse immune antitumorale	93
5.1	. Effet de l'hypoxie sur les effecteurs cytotoxiques	93
5.2	. Effet de l'hypoxie sur les cellules myéloïdes suppressives	94
5.3	. Effet de l'hypoxie sur les macrophages associés aux tumeurs	94
6.	Les approches thérapeutiques	95

OBJ	ECTIFS DES TRAVAUX	.96
RES	ULTATS	99
I.	Mise en évidence de l'effet délétère des fibroblastes associés au mélanome et de leur	
	sécrétion de métalloprotéinases matricielles sur la susceptibilité des cellules tumoral	es

# à la lyse par les effecteurs cytotoxiques NK......100

Article: Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK cellmediated killing through matrix-metalloproteinases secretion

s immuno-modulatrices des	II. Mise en évidence de l'influence de l'hypoxie sur les capacités
	fibroblastes associés au mélanome
110	CONCLUSION ET DISCUSSION CENEDALE

CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE	
PERSPECTIVES	
BIBLIOGRAPHIE	129
ANNEXES	

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Spectre morphologique des néoplasmes mélanocytaires14
Figure 2 : Modèles de dissémination métasatique du mélanome16
Figure 3 : Utilisation d'anticorps bloquants, les « immune checkpoints » en immunothérapie         antitumorale
Figure 4 : La réponse immune anti-tumorale
Figure 5 : Représentation schématique de la synapse immunologique entre lymphocyte T et cellule cible
Figure 6 : Modèle de développement <i>in vivo</i> des cellules NK humaines
Figure 7: Schéma des sous-types de cellules NK
Figure 8 : Les principaux récepteurs des cellules NK
Figure 9 : NKG2D agit comme un récepteur activateur et de co-stimulation
Figure 10 : Les deux familles génétiques des ligands des récepteurs NKG2D
Figure 11 : Les deux voies d'apoptose induites par les cellules effectrices
Figure 12 : La voie d'apoptose induite par le granzyme B45
Figure 13 : La transduction du signal apoptotique par les récepteurs à domaine de mort FAS, DR4
et DR5 se déroule par des étapes partagées
Figure 14 : Les dix propriétés du cancer
Figure 15 : Le concept d'immunoediting
Figure 16 : Les cellules immunitaires et non immunitaires dans le stroma tumoral présentant
des fonctions immunosuppressives
Figure 17 : Les origines et l'influence de l'hétérogénéité de la tumeur
<b>Figure 18 :</b> Vue schématique de la structure des membres de la famille des MMPs et de la relation avec d'autres membres de la superfamille des metzincines
Figure 19 : Origine de l'expression des MMPs dans le stroma tumoral
Figure 20 : Activation des fibroblastes
Figure 21 : Les fibroblastes associés aux cancers au niveau de la matrice extracellulaire70
Figure 22 : Les multiples origines des CAFs dans le stroma tumoral

Figure 23 : Effets pro et anti-tumoraux des CAFs	76
Figure 24 : Polarisation des CAFs	77
Figure 25 : Schéma représentatif des facteurs solubles secretés par les CAFs	79
Figure 26 : La modulation du système immunitaire inné et adaptatif par les CAFs	
Figure 27 : Section histologique de foyers hypoxiques dans le mélanome	87
Figure 28 : Influence de l'hypoxie sur l'angiogenèse tumorale	
Figure 29 : Les différents gènes régulés par HIF-1α	90
<b>Figure 30 :</b> Régulation de HIF-1α par hydroxylation des résidus proline	91
<b>Figure 31 :</b> Schéma illustrant le mécanisme d'action des CAFs altérant la sensibilité des ce tumorales à la lyse induite par les cellules NK	llules 122

## LISTE DES TABLES

<b>Table 1 :</b> Fréquence des mutations au cours du développement du mélanome15
<b>Table 2 :</b> Liste des principaux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires développés en clinique pour le mélanome métastatique
<b>Table 3 :</b> Voies de signalisations majeures régulant l'expression des ligands de NKG2D
Table 4 : Classification des métalloprotéinases matricielles humaines    62

#### LISTE DES ABREVIATIONS

AAC: Adipocytes associés aux cancers **ADAM:** A disintegrin and metalloprotease ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity **ADN:** Acide désoxyribonucléique Ag: Antigène **AICD:** Activated-induced cell death **ARG:** Arginase **ARN:** Acide ribonucléique BAK: Bcl-2 homologous antagonist/killer **BAX:** Bcl-2 associated X protein BCL-2: B-cell lymphoma 2 BID: BH3-interacting domain death agonist CA9: Carbonic anhydrase 9 **CAD:** Caspase-activated DNase **CAF:** Cancer-associated fibroblast **CAR:** Chimeric antigen receptor **CCR:** Chemokine, CC motif, receptor **CD:** Cluster of differentiation **CDK:** Cyclin-dependent kinase **CM:** Conditioned medium CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité **COX-2:** Cyclooxygénase 2

**CPA:** Cellule présentatrice d'antigène **CPE** : Cellule progénitrice endothéliale **CSC:** Cellule souche cancéreuse **CSF-1:** Colony-stimulating factor-1 **CSM:** Cellule souche mésenchymateuse **CTL:** Cytotoxic T lymphocytes CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 CXCR: CXC chemokine Receptor **DC:** Dendritic cell **DNAM-1:** DNAX accessory molecule-1 **EGFR:** Epidermal growth factor receptor **EMT:** Epithelial-mesenchymal transition **ENTPD1:** Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 **EPO:** Erythropoietine **ERK:** Extracellular signal-regulated kinase **FADD:** FAS-associated protein with death domain **FAP:** Fibroblast activation protein **FSP1:** Fibroblast-specific protein 1 Gzm: Granzyme **HES:** Hématoxyline-éosine-safran

HGF: Hepatocyte growth factor

HIF-1: Hypoxia-inducible factor HLA: Human leucocyte antigen HRE: Hypoxia response element IAP: Inhibitor of apoptosis proteins IFNy: Interferon gamma **IGF:** Insulin growth factor **ICAM:** Intercellular cell adhesion molecule **IDO:** Indoleamine-2, 3-Dioxygenase **IL:** Interleukine ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif **ITIM:** Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif KIR: Killer cell immunoglobulin like receptors LAK: Lymphokine-activated killer cells LB: Lymphocytes B LFA-1: Leukocyte function-associated antigen-1 **MAF:** Metastasis-associated fibroblasts **MAPK:** Mitogen-activated protein kinase **MDSC:** Myeloid-derived suppressor cells

MEC: Matrice extracellulaire

**MICA/B:** MHC class I polypeptide-related sequence

MITF: Microphthalmia transcription factor

MMP: Matrix metalloproteinase

**MOMP:** mitochondria outer membrane permeabilization

NCR: Natural cytotocicity receptor

NF: Normal fibroblast

**NF-κb:** Nuclear factor-kappa B

NK: Natural killer

NKG2D: Natural killer group 2D

NO: Nitric oxyde

NOS: Nitric oxide synthases

P53: Protéine 53

**PBMC:** Peripheral blood mononuclear cell

PCR: Polymerase chain reaction

PD-1: Programmed cell death protein 1

**PDGFR:** Platelet derived growth factor receptor

**PFN:** Perforine

**PGE2:** Prostaglandine E2

PHD: Prolyl-hydroxylases

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

**PRR:** Pattern recognition receptor

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

**ROS:** Reactive oxygen species

 $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -actine des cellules musculaires lisses

SDF-1: Stromal cell-derived factor-1

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**STAT:** Signal transducer and activator of transcription

TAA: Tumor-associated antigens

TAM: Macrophages associés aux tumeurs

TIL: Tumor-infiltrating lymphocytes

**TIMP:** Tissue inhibitor of metalloproteinase

**TGF-**β: Transforming growth factor-beta

TLR: Toll-Like Receptor

TNF: Tumor necrosis factor

**TRADD:** TNFR-associated death domain

**TRAIL:** Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand

Treg: lymphocyte T régulateur

**TSLP:** Thymic stromal lymphopoietin

**ULBP:** UL16-binding proteins

**VEGF:** Vascular endothelial growth factor

**VHL:** Von Hippel-Lindau

#### **AVANT-PROPOS**

Il est communément admis que l'une des fonctions physiologiques du système immunitaire est de prévenir l'expansion de cellules transformées et de détruire ces cellules avant qu'elles ne deviennent des tumeurs, ce phénomène étant nommé « immunosurveillance anti-tumorale». Toutefois, l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale est souvent inefficace. Pour pallier à ce manque d'efficacité, plusieurs nouvelles stratégies thérapeutiques ont vu le jour ces dernières décennies afin de potentialiser cette réponse immune antitumorale. Ainsi, l'immunothérapie continue à prendre une place de plus en plus importante dans le traitement des cancers aux côtés du trio thérapeutique classique que constituent la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. L'objectif de l'immunothérapie est d'induire ou de potentialiser une réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre les cellules tumorales permettant ainsi à l'organisme de lutter plus efficacement contre la tumeur maligne et in fine la détruire. Néanmoins, malgré les progrès de l'immunothérapie, les résultats cliniques demeurent encore limités dans de nombreux cas, en particulier à cause de l'insuffisance de la réaction immunitaire locale et de la résistance des cellules tumorales à l'action cytotoxique des cellules effectrices. L'étude encore plus poussée de la réponse immunitaire anti-tumorale et de sa potentialisation est donc nécessaire afin d'améliorer l'efficacité des approches d'immunothérapie actuelles et donc la survie des patients atteints de cancers.

Dans ce contexte, il est devenu clair au cours des dernières années que la progression tumorale n'est pas seulement dépendante des cellules néoplasiques. En effet, les cellules qui composent le stroma (ou microenvironnement) tumoral sont à l'heure actuelle reconnues comme une composante critique de cette progression en favorisant notamment la survie et la prolifération des cellules tumorales, l'angiogenèse, le processus d'invasion conduisant à la formation de métastases mais aussi l'immunosuppression. Deux composantes majeures du microenvironnement tumoral auxquelles nous nous sommes plus particulièrement intéressés sont les fibroblastes présents au sein de la tumeur et possédant un phénotype dit « activé », appelés fibroblastes associés aux tumeurs (Cancer-Associated Fibroblasts; CAFs) et l'hypoxie tumorale. En effet, l'étude des différents éléments du microenvironnement tumoral impliqués dans le contrôle de la réponse immune anti-tumorale est primordiale afin d'améliorer les traitements actuels. C'est dans ce contexte que se sont inscrits les axes principaux de mes travaux de thèse qui ont visé à étudier d'une part l'effet des CAFs sur la susceptibilité des cellules de mélanome à la lyse induite par les effecteurs cytotoxiques et à identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents impliqués, et d'autre part à étudier l'effet du dialogue entre l'hypoxie et les capacités immunosuppressives des CAFs.

La première partie de ce manuscrit présente les connaissances actuelles sur le mélanome et ses traitements, sur la réponse immune anti-tumorale, ainsi que sur le microenviroennement tumoral et notamment les deux composantes « cellulaire et métabolique » majeures: les fibroblastes associés aux cancers et l'hypoxie respectivement. Dans la seconde partie de cette thèse, je présenterai l'ensemble des résultats obtenus et des travaux en cours avant de terminer par une discussion concernant l'ensemble de ces travaux et de leurs applications potentielles.

# Introduction

### I. Le mélanome

#### 1. Généralités

Le mélanome représente un problème de santé publique majeur en raison de son incidence qui double environ tous les dix ans dans les pays qui la mesurent. En France, celle-ci est estimée entre cinq à huit nouveaux cas par an pour 100.000 habitants, ce qui est proche de l'incidence observée dans la plupart des pays d'Europe (Bajetta et al., 2002).

Le mélanome est une tumeur cutanée particulièrement agressive, décrite pour la première fois en 1787, qui se développe à partir des mélanocytes épidermiques qui sont les cellules pigmentaires présentes essentiellement de manière isolée dans la couche basale de la peau entre l'épiderme et le derme. Le mélanome peut ainsi se développer au niveau de n'importe quelles zones anatomiques comportant des mélanocytes. Même si le mélanome représente le cancer de la peau le moins fréquent par rapport aux autres cancers cutanés beaucoup moins invasifs tels que les carcinomes baso-cellulaires et épidermoïdes (plus de 90% des cancers de peau) (Mortier et al., 2004) et en dépit d'un dépistage de plus en plus précoce de la maladie et de l'exérèse complète de la lésion primitive, le mélanome reste un cancer dont la létalité reste élevée, notamment du fait de sa forte capacité à métastaser dans différents organes distants. Cette forte capacité métastatique est à mettre en relation avec le fait que les cellules cancéreuses se developpent profondément dans l'épiderme, ce qui augmente leur proximité avec les vaisseaux sanguins. Dans l'ensemble 20% des patients atteints de mélanome développeront une maladie métastatique dont le pronostic est extrêmement mauvais (Balch et al., 2001). La dissémination des cellules tumorales d'origine cutanée se fait principalement par voie lymphatique (Xu et al., 2012). Les métastases à distance sont le plus souvent localisées au niveau pulmonaire, hépatique, osseux et du cerveau (Sleeman, 2012).

Finalement, les mélanomes de peau exposée au soleil, sont des tumeurs hétérogènes, qui peuvent être classées en sous-types sur la base de leurs niveaux cumulatifs d'exposition aux rayons ultraviolets (UV). Les néoplasies mélanocytaires peuvent également être classées selon leur niveau de progression, allant d'une tumeur bénigne, tel un naevus, à un néoplasme malin, comme un mélanome métastatique. Chaque sous-type de mélanome peut évoluer selon des trajectoires distinctes, en passant par différentes étapes de transformation (Shain and Bastian, 2016).

#### 2. Le développement du mélanome

#### 2.1. Généralités

Les mélanomes sont associés à différents types de lésions précurseurs allant d'un nævus bénin à un nævus dysplasique et à un mélanome *in situ* et invasif (**figure 1**). Les mélanomes sont appelés métastatiques une fois que leurs cellules ont diffusé au-delà du site local de la tumeur primaire et colonisé d'autres tissus/organes. Semblables à de nombreuses tumeurs solides, les métastases de mélanome apparaissent généralement en premier au niveau des ganglions lymphatiques des aires de drainage de la tumeur primaire, tandis que les métastases à distance impliquent des sites viscéraux et ont tendance à apparaître plus tard, ce qui a conduit à l'hypothèse que la dissémination métastatique progresse en série à partir de la tumeur primaire vers des métastases régionales et enfin vers des métastases distantes. Le retrait préventif de la région ganglionnaire lymphatique est ainsi assuré de façon régulière avec des intentions curatives (Pasquali et al., 2012).



**Figure 1: Spectre morphologique des néoplasmes mélanocytaires.** Ligne du haut: Des images cliniques montrent un naevus autonome, un naevus dysplasique, un mélanome *in situ* et un mélanome invasif. Deuxième ligne: schémas illustrant les caractéristiques architecturales pour chaque type de lésion. Lignes 3-5: photo-micrographies illustrant les caractéristiques histopathologiques représentatives de chaque type de lésion. D'après (Shain and Bastian, 2016).

#### 2.2. Physiopathologie moléculaire

Le passage d'un nævus bénin à un nævus dysplasique est caractérisé par une expansion clonale, une réduction de l'apoptose et une diminution de la sénescence des mélanocytes (Slominski et al., 2001). Cette phase est ainsi caractérisée par des altérations génétiques ou épigénétiques affectant la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Gray-Schopfer et al., 2007). Les gènes mutés sont pour la plupart des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs (comme NRAS, CDKN2A, PTEN, p53...) et sont impliqués dans plusieurs voies de signalisation (table 1). La

mutation la plus fréquente dans le mélanome cible la kinase BRAF et est présente dans 50 à 70% des cas. Parmi ces mutations, le remplacement de la valine en position 600 par un acide glutamique (V600E) est particulièrement important puisqu'il est présent dans 50% des mélanomes. Cette mutation de BRAF entraîne une activation anormale de la signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) en aval de la kinase BRAF conduisant à une activation de la prolifération et une augmentation de la capacité de survie des cellules tumorales. Il existe également d'autres mutations plus rares de la valine 600 remplacée dans certains cas par une lysine (V600K) ou une arginine (V600R) (Arkenau et al., 2011; Scolyer et al., 2011). La présence de BRAF muté est également détectée dans les nævi bénins et dysplasiques montrant qu'il s'agit d'un évènement précoce dans la progression du mélanome. De plus, les souris transgéniques mutées BRAF V600E forment spontanément des mélanomes (Dhomen et al., 2009).

Type de gène	Gène	Type d'altération et fréquence dans les mélanomes (%)		
Proto-oncogènes	BRAF	muté dans 50-70% des cas		
	NRAS	muté dans 15-30% des cas		
	AKT3	surexprimé		
Suppresseurs de tumeurs	CDKN2A	supprimé, perdu ou sous-exprimé dans 30-70% des cas		
	PTEN	supprimé ou perdu dan 5-20% des cas		
	APAF-1	sous-exprimé dans 40% des cas		
	P53	perdu ou muté dans 10% des cas		
Autres	Cycline D1	amplifié dans 6-44% des cas		
	MITF	amplifié dans 15-20% des cas		

 Table 1: Fréquence des mutations au cours du développement du mélanome. Plusieurs gènes, oncogènes,

 suppresseurs de tumeurs ou autres sont dérégulés dans le mélanome. La fréquence et le type d'altérations rencontrées

 pour chacun d'entre eux sont indiqués dans le tableau. D'après (Gray-Schopfer et al., 2007).

#### 2.3. La vie d'une métastase de mélanome

Les métastases de mélanome ont tendance à avoir l'indice de prolifération le plus élevé de toutes les étapes de progression du mélanome (Straume et al., 2000). De plus, l'hétérogénéité génétique d'une métastase individuelle devrait être inférieure à celle de la tumeur primaire en raison de la diversité réduite de sa population lors de l'expansion clonale d'une petit nombre de cellules fondatrices. Néanmoins, des sous-clones sont détectables au niveau des metastases (Sanborn et al., 2015). Les mutations affectant les protéines mutantes BRAF V600E, peuvent ainsi conduire à l'émergence simultanée de clones résistants à différentes thérapies ciblées au niveau de nombreux sites métastatiques distants (Wagle et al., 2011). Des modèles de dissémination métastatique sont présentés dans la **figure 2.** 





**Figure 2: Modèles de dissémination métasatique du mélanome**. **a**. les cellules de mélanome primaire diffusent en parallèle à des sites locaux et distants à travers le corps. Les métastases sont d'abord évidentes dans les ganglions lymphatiques locaux, en raison de leur connexion directe au mélanome primaire par des vaisseaux lymphatiques, qui pourrait permettre à l'ensemencement répété des ganglions lymphatiques, ce qui accélère la croissance des métastases ganglionnaires. Les cellules tumorales circulantes peuvent se distribuer dans différents sites métastatiques existants et au niveau de la tumeur primaire. **b**. Une petite proportion de métastases apparaît sans tumeur primaire apparente. L'histoire de l'évolution de ces mélanomes d'origine primaire inconnue reste encore mal étudiée, mais il semblerait que certains peuvent représenter des mélanomes primaires qui ont surgi à partir de cellules diffusées de précurseurs bénins tels que les naevi et acquièrent leurs altérations oncogéniques secondaires et tertiaires après la colonisation d'autres sites. D'après (Shain and Bastian, 2016).

#### 3. Les traitements

Environ 90% des mélanomes diagnostiqués sont des tumeurs primaires sans signe évident de la présence de métastases (stade I) et sont systématiquement traités par exérèse chirurgicale. La survie à 5 ans des patients atteints de ce type de tumeur est de 75 à 85% (Garbe et al., 2010). Le problème du traitement se pose lorsque les patients présentent des signes de dissémination métastatique puisque dans ce cas la survie n'excède pas les 10%. Des thérapies ciblées prometteuses sont ainsi développées comme l'utilisation d'inhibiteurs de BRAF. Cependant de nombreux cas de résistance à ces composés sont déjà recensés. Plus récemment, des traitements par immunothérapies pour les stades II et III ont été développés et ont révolutionné la prise en charge thérapeutique du mélanome.

#### 3.1. La chirurgie

La chirurgie est le principal traitement des cancers cutanés. La chirurgie de la tumeur primaire s'effectue en deux fois avec une première intervention visant à retirer la lésion afin qu'elle soit analysée par un anatomopathologiste. Suite à cette analyse, l'excision est reprise en enlevant une bande de peau saine (appelée marge de sécurité) plus ou moins importante suivant la taille de la lésion. L'exérèse du ganglion sentinelle n'est pas pratiquée de manière systématique mais est assez fréquente dans le cas de tumeurs profondes. Pour localiser les ganglions sentinelles, le chirurgien injecte un produit coloré ou radioactif au voisinage de la tumeur. Lors de l'opération, un à deux lymphatiques sont habituellement enlevés. Ils ensuite ganglions sont analysés par anatomopathologie. Dans le cas où des micro-métastases sont détectées, on procède au curage total des ganglions situés dans la zone de drainage du mélanome primaire (Garbe et al., 2010; Testori et al., 2009). L'exérèse des métastases est également réalisée lorsqu'elles sont accessibles. En cas de métastases trop nombreuses ou trop étendues, la chirurgie n'est plus prioritaire.

#### 3.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie n'est pas l'approche la plus utilisée pour le mélanome. En effet, les mélanomes très avancés répondent assez mal à la chimiothérapie. Au fil des dernières décennies, différents régimes de chimiothérapie ont néanmoins été utilisés. Plusieurs antinéoplasiques ont été étudiés, parfois en monothérapie, parfois en combinaison. Malheureusement, aucune étude clinique de phase III n'est parvenue à démontrer une amélioration de la survie globale, et ce, pour aucun régime de chimiothérapie (Agarwala, 2009; Eggermont and Kirkwood, 2004; Petrella et al., 2007; Trinh, 2008). Par exemple, la dacarbazine et son pro-médicament, le témozolomide, sont les plus largement employés mais le taux de réponse obtenu varie de 8 à 20 %, et la durée médiane de cette réponse est de 4 à 6 mois (Lee et al., 1995). De plus, et dans la majorité des cas, il s'agit d'une réponse partielle. La plus grosse étude de phase III menée sur la dacarbazine dans le traitement du mélanome métastatique a révélé des résultats encore moins satisfaisants, les patients avant reçu la dacarbazine à raison de 1000 mg/m<sup>2</sup> par voie intraveineuse tous les 21 jours ont montré un taux de réponse objective de seulement 7,5% (Bedikian et al., 2006). D'autres études à répartition aléatoire rapportent également une survie sans progression de l'ordre de 1,5 à 2 mois seulement (Falkson et al., 1998; Middleton et al., 2000). De façon générale, l'ensemble de ces travaux rapportent que la survie globale des patients traités avec de la dacarbazine varie de 6 à 9 mois. Ces valeurs, superposables à celles observées lors de l'évolution naturelle d'un mélanome métastatique, soulignent une fois de plus le manque d'efficacité de ce traitement (Korn et al., 2008). Pourtant, faute de meilleures alternatives, ces résultats ont suffi à positionner durant des dizaines d'années la dacarbazine comme le traitement standard. Le témozolomide est quant à lui un pro-médicament qui subit une transformation en MTIC (5-[3-méthyltriazen-l-yl] imidazole- 4-carboxamide), le métabolite actif de la dacarbazine (Stevens et al., 1987). Cependant, et contrairement à la dacarbazine, le témozolomide traverse la barrière hématoencéphalique et peut potentiellement agir contre les métastases cérébrales. Malgré cela, deux études cliniques qui l'ont comparé à la dacarbazine ne sont pas parvenues à démontrer une amélioration significative de la survie sans progression et de la survie globale.

#### 3.3. La radiothérapie

La radiothérapie est relativement peu utilisée dans le cas du mélanome car le mélanome est communément admis comme une tumeur radio-résistante. Elle est prescrite dans le cas de tumeurs primaires, de ganglions lymphatiques envahis ou de métastases quand les lésions sont peu ou pas accessibles et donc inopérables par chirurgie. C'est notamment le cas des métastases osseuses et cérébrales. La radiothérapie est en général utilisée de façon palliative pour soulager les symptômes comme par exemple dans le cas de métastases osseuses venant comprimer la moelle épinière (Garbe et al., 2010; Khan et al., 2011; Testori et al., 2009).

#### 3.4. Les thérapies ciblées

La stratégie de thérapies ciblées est de plus en plus explorée dans de nombreux cancers. Il s'agit de cibler spécifiquement des protéines ou des voies de signalisation connues pour être mutées et/ou dérégulées dans un cancer donné et ainsi épargner les cellules saines de l'organisme. Dans le cas du mélanome, les voies MAPK et PI3K/AKT sont particulièrement dérégulées (80% des cas) et de nombreux inhibiteurs spécifiques ciblant ces voies ont été testés avec parfois des résultats très encourageants (Davies and Samuels, 2010; Seetharamu et al., 2009; Singh et al., 2008). Plusieurs inhibiteurs de la kinase BRAF ont été testés pour le traitement du mélanome car comme cela a été évoqué précédemment cette voie de signalisation conduisant à la prolifération et la survie des cellules est très fréquemment dérégulée dans ce type de pathologie (Arkenau et al., 2011).

#### 3.5. L'immunothérapie

#### 3.5.1. Généralités

L'immunothérapie est souvent utilisée comme traitement adjuvant (en complément de la chirurgie) pour les mélanomes de stade II et III (Agarwala and O'Day, 2011). Il est bien documenté que le mélanome est une tumeur immunogène, et cette hypothèse est étayée par les observations cliniques, telles que des rémissions complètes et des régressions spontanées des lésions de mélanome (McCardle et al., 2009). L'interface entre la réponse immunitaire et le mélanome représente une

tentative de l'hôte de supprimer la croissance tumorale, mais constitue également un paramètre clé dans l'histoire naturelle de la maladie. Les thérapies adjuvantes systémiques, telle que l'administration d'interféron (IFN- $\alpha$ 2b), ont validé les mérites de l'activation de la réponse immunitaire qui s'oppose au développement tumoral (Hansson et al., 2011) et le traitement à hautes doses d'interleukine-2 (IL-2) a été pendant longtemps la seule immunothérapie approuvée pour les mélanomes de stade IV par la FDA (Food and Drug Administration). On a ainsi constaté au cours de ce traitement une réponse objective de 15,5 à 20% avec une rémission complète dans 5 à 15% des cas (Phan et al., 2001; Tarhini et al., 2007). Des traitements par injection intra-tumorale d'IL-2 ont également montré des résultats encourageants pour des patients présentant des métastases cutanées sans atteinte des ganglions lymphatiques et sans métastases viscérales, avec un taux de réponses objectives de 40 et 30% respectivement pour les stades III et IV (Weide et al., 2011).

A l'heure actuelle, les efforts de recherche en ciblant les points de contrôle immunitaires (ou « immune checkpoints ») des cellules T, tels que CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) avec l'ipilimumab, visant à surmonter la tolérance et à améliorer les réponses immunitaires contre le mélanome, ont permis de révolutionner la prise en charge thérapeutique du mélanome (Mortier et al., 2004). Ces dernières années, l'approbation par la FDA et l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) d'anticorps anti-« immune checkpoints » a ainsi considérablement amélioré les résultats cliniques pour les patients atteints de mélanome avancé (table 2). Ces anticorps monoclonaux antagonistes sont capables de « booster » l'immunité antitumorale dormante ou épuisée, ce qui a conduit à des réponses partielles et complètes durables chez un grand nombre de patients (figure 3). Le nivolumab et le pembrolizumab ciblent PD-1 (Programmed cell death protein 1) et se sont révélés supérieurs à l'ipilimumab seul. La combinaison d'ipilimumab et de nivolumab a donné des taux de réponse plus élevés, une régression tumorale plus importante et une survie sans progression plus longue que la monothérapie seule. En effet, les approches anti-CTLA-4 et anti-PD-1 montrent une efficacité augmentée par rapport à l'administration systémique d'IL-2 et peuvent produire des taux de réponse supérieurs à 50% lorsqu'ils sont administrés en combinaison (Redman et al., 2016). D'autres immunothérapies prometteuses pour le mélanome font également l'objet d'essais cliniques, dans le but de définir le rôle et l'efficacité d'autres inhibiteurs des points de contrôle immunitaires comme traitement adjuvant, d'identifier les stratégies de combinaison optimales et de développer des biomarqueurs prédictifs fiables pour guider la sélection de traitements individuels pour chaque patient (Redman et al., 2016).

Drug	Target	Antibody class	Producer	Clinical stage completed in melanoma
Ipilimumab	CTLA-4	IgG1 human	Bristol-Myers Squibb	FDA approved 2011
Nivolumab	PD-1	IgG4 fully human	Bristol-Myers Squibb	FDA approved 2014
Pembrolizumab	PD-1	IgG4 humanized	Merck	FDA approved 2014
Pidilizumab	PD-1	IgG1 humanized	Curetech	Phase II
Atezolizumab	PD-L1	IgG1 engineered fully human	Roche	Phase II
BMS-935559	PD-L1	IgG4 fully human	Bristol-Myers Squibb	Phase I
Durvalamab	PD-L1	IgG1 engineered fully human	MedImmune/AstraZeneca	Phase I/II
IMP321	LAG3	LAG3-Ig fusion	Prima	Phase I ongoing

**Table 2:** Liste des principaux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires développés en clinique pour le mélanome métastatique. D'après (Herzberg and Fisher, 2016).

#### 3.5.2. Les anticorps monoclonaux anti-CTLA-4

La protéine CTLA-4 est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T. Il s'agit d'un compétiteur naturel de CD28 pour la liaison au ligand B7/CD80 situé sur la surface des cellules présentatrices d'antigènes. L'activation de CTLA-4 par son ligand a un effet inhibiteur sur l'activation des lymphocytes T et donc sur la réponse immune (alors que CD28 a un effet activateur). L'intérêt de l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CTLA-4 en clinique est donc de supprimer l'inhibition de l'activation des lymphocytes T en espérant induire une meilleure réponse immunitaire contre la tumeur (figure 3) (Robert and Ghiringhelli, 2009). Comme mentionné précedemment, il existe à l'heure actuelle deux anticorps monoclonaux thérapeutiques ciblant CTLA-4 sur le marché: le tremelimumab et l'ipilimumab. Alors que l'ipilimumab augmente l'activité immunitaire contre les cellules tumorales, il peut également rompre la tolérance immunitaire au soi et engendrer des effets secondaires auto-immuns. De tels événements indésirables se manifestent le plus souvent sous forme de dermatite, colite, hépatite, hypophysite et thyroïdite (Hodi et al., 2010). Une méta-analyse (chez des sujets présentant diverses tumeurs malignes, notamment le mélanome) a calculé une incidence globale d'événements indésirables chez 72% des patients traités par ipilimumab, avec une augmentation de 24% d'incidence des effets indésirables de haut grade (Bertrand et al., 2015). Néanmoins, ces effets secondaires peuvent être contrôlés par corticothérapie ou grâce à des agents immuno-suppressifs (Hodi et al., 2010; Weber et al., 2012). De plus, environ 10% des patients qui reçoivent l'ipilimumab présentent initialement une phase dite de « pseudo-progression », où les tumeurs semblent grossir et les lésions se développent, potentiellement en raison d'une infiltration de cellules immunitaire améliorée, cette phase précède une diminution de la taille de la tumeur (Wolchok et al., 2009).

#### 3.5.3. Les anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1

Peu de temps après le développement de l'ipilimumab, des données décrivant l'activité clinique d'un anticorps monoclonal anti-PD-1 (nivolumab) chez les patients atteints de néoplasmes avancées sont apparues (**figure 3**) (Brahmer et al., 2010; Topalian et al., 2012). PD-1 est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T activés et sa liaison avec son ligand PD-L1 exprimé à la surface des cellules tumorales bloque la prolifération des cellules T. Chez les patients atteints de mélanome avancé, de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) et des carcinomes à cellules rénales, des réponses de 17 à 34% avec une durée de réponse médiane de 13-24 mois ont été observées après traitement. Le nivolumab engendre également certains effets secondaires, avec des toxicités de grade 3-4 reliées au traitement se produisant chez néanmoins moins de 15% des patients (Topalian et al., 2012).

En ce qui concerne le mélanome, le taux de survie globale pour les patients atteints de mélanome traités par nivolumab est à l'heure actuelle de 62% à 1 an, 43% à 2 ans et de 41% à 3 ans (Topalian et al., 2014). De plus, un essai clinique de phase I utilisant un autre anticorps anti-PD-1 (pembrolizumab) a également montré une forte activité clinique. Le pembrolizumab produit ainsi une réponse durable à la fois chez des patients atteints de mélanome (sans autre traitement préalable) avec un taux de réponse objective (ORR) de 33% (Hamid et al., 2013). Les traitements avec des anticorps anti-PD-L1 en monothérapie chez les patients atteints de mélanome avancé sont pour l'instant limités et toujours en cours d'analyse. Néanmoins, un patient sur huit atteints de mélanome lors de d'essai clinique de phase I avec du durvalumab (anti-PDL1) présente une réponse partielle (Carbognin et al., 2015).



**Figure 3:** Utilisation d'anticorps bloquants, les « immune checkpoints » en immunothérapie antitumorale. Cette approche d'immunothérapie utilise des anticorps dirigés contre CTLA-4, qui bloquent l'immunosuppression dépendante de l'interaction entre les membres de la famille B7 (sur les cellules présentatrices d'antigène) et CTLA-4 (sur les cellules

T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>). Un deuxième point de contrôle important dépendant de l'interaction entre PD-1 exprimés sur les lymphocytes T et son ligand PD-L1 exprimé par les cellules présentatrices d'antigène ou les cellules tumorales, fait l'objet de plusieurs essais cliniques récents. D'après (Drake et al., 2014).

#### II. La réponse immune anti-tumorale

#### 1. Le concept d'immunosurveillance

Le concept d'immunosurveillace anti-tumorale a été initialement émis par Paul Ehrlich en 1909. A partir des connaissances acquises en transplantation et en immunité anti-tumorale, en particulier grâce à la découverte d'antigènes associés aux tumeurs (TAA), les bases fondamentales de ce concept ont été formellement établies dès les années 1970 par Macfarlane Burnet et Lewis Thomas (Burnet, 1970). Ce concept repose sur l'idée que le système immunitaire, grâce à sa capacité à reconnaître les cellules tumorales, pourrait intervenir pour prévenir l'apparition des tumeurs et limiter leur croissance. Ainsi le caractère immunogène d'une tumeur fut-il démontré à l'aide de modèles expérimentaux dans lesquels la capacité à rejeter une tumeur pouvait être transmise à un receveur syngénique naïf par les lymphocytes T d'un animal qui a rejeté la même tumeur. Depuis, de nombreuses preuves expérimentales se sont accumulées pour soutenir ce concept (Smyth et al., 2001).

#### 2. Déroulement de la réponse immunitaire : généralités

Notre corps est continuellement exposé à de nombreuses maladies et pathogènes. Pour se défendre et les combattre, il est doté d'un mécanisme de résistance nommé l'immunité (du latin *immunitas*, signifiant « l'exemption de »). La lutte contre les agents infectieux et les cellules tumorales par notre système immunitaire dépend d'une première ligne de défense qui est l'immunité innée (également appelée immunité naturelle, native ou non spécifique), cette réponse n'impliquant pas la reconnaissance spécifique d'antigène et ne nécessitant donc pas une sensibilisation préalable. Cette réponse innée est assurée par plusieurs effecteurs dont les plus importants sont les granulocytes, les macrophages ainsi que les cellules tueuses naturelles ou « Natural Killer » (NK) et les cellules NKT, et qui précède et régule le développement de la réponse immune spécifique.

Cette reconnaissance immunitaire innée est notamment basée sur la détection de signatures moléculaires invariantes (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Des récepteurs de surfaces appelés « pattern recognition receptors » (PRR) sont exprimés par certaines cellules de l'immunité innée. Il existe plusieurs classes de PRR, les principaux et les plus décrits étant les TLR (Toll-Like Receptors) capables d'activer directement les cellules immunitaires. Ces récepteurs reconnaîssent des molécules conservées par les cellules hôtes appelées motifs moléculaires associés à des

pathogènes (PAMP) (Medzhitov and Janeway, 1997) qui sont suceptibles d'être exprimés par les cellules tumorales. Ces récepteurs sont principalement exprimés par les macrophages et les cellules dendritiques (DC/dendritic cell) (Ray et al., 2013) et participent à leur activation et à l'induction de la sécrétion d'interférons de type I (IFN  $\alpha$  et  $\beta$ ) qui sont cruciaux pour la réponse immune antitumorale notamment en activant différentes populations leukocytaires de l'immunité innée.

Comme décrit précédemment, la réponse innée fait notamment intervenir les macrophages qui proviennent de précurseurs se trouvant initialement dans la moelle osseuse avant de les retrouver dans la circulation sanguine sous la forme de monocytes. Ces macrophages sont considérés comme des cellules effectrices majeures de l'immunité innée car ils sont stratégiquement situés sous les surfaces épithéliales. Lors de l'activation des macrophages, ceux-ci-sécrètent différentes cytokines telles que l'interleukine (IL)-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF (Tumor Necrosis Factor). Ces cytokines peuvent agir localement pour induire une réponse inflammatoire correspondant à un élément clé des réponses immunitaires innées et adaptatives (Snyder et al., 2016). Dans un contexte tumoral, les macrophages qui sont recrutés au sein des sites tumoraux grâce aux chimiokines chimioattractives, représentent une composante majeure de l'infiltration de la plupart des tumeurs et sont impliqués dans la phagocytose des cellules tumorales.

Une autre composante cellulaire importante qui intervient au cours de la réponse immunitaire innée, les cellules NK, qui jouent un rôle clé et incontournable dans la lyse des cellules tumorales de manière spontanée en l'absence d'immunisation spécifique préalable, la lyse est suivie par la libération de TAA qui seront capturés par les DC immatures qui subissent un processus de maturation suite à cette capture d'Ag et à la réception de signaux de danger (Hsp, calreticulin,...) ainsi qu'à leur sécrétion d'IFN $\alpha$  qui participe à l'activation d'autres cellules de l'immunité innée et à leur propre activation. Ce processus est essentiel pour l'activation des cellules de l'immunité adaptative (**figure 4**) (Mantovani et al., 1992). En effet, les cellules dendritiques sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative car elles jouent le rôle de CPA (cellules présentatrices d'antigènes), pour présenter les antigènes tumoraux aux cellules de l'immunité adaptative.

L'immunité adaptative (également appelée immunité acquise ou spécifique) se développe plus lentement et surtout plus tardivement que l'immunité innée et peut assurer une protection à long terme. Elle a l'avantage d'être beaucoup plus efficace car elle est plus spécifique. En effet, les cellules de l'immunité adaptative reconnaissent spécifiquement les antigènes (Ag) et mettent en place un système de mémoire immunologique. Il existe deux types d'immunité adaptative, appelés

immunité humorale et immunité à médiation cellulaire faisant intervenir respectivement les lymphocytes B, qui sécrètent des anticorps (Ac) et les lymphocytes T qui tuent directement les cellules infectées ou les cellules tumorales. Cette réponse immunitaire comprend plusieurs étapes successives incluant une reconnaissance de l'Ag, une activation du lymphocyte qui lui permettra d'éliminer la source de cet Ag et une phase de déclin qui est suivie de la mise en place d'une mémoire vis à vis de ce même Ag (Gajewski et al., 2013).



**Figure 4: La réponse immune anti-tumorale**. Les cellules de l'immunité innée (macrophages (Mø), NK, NKT) sont la première ligne de défense contre la progression des cellules cancéreuses. Les précurseurs des DC tout comme les Mø, NK, NKT reconnaissent des molécules PAMPs à la surface des cellules tumorales par le biais de leurs récepteurs PRR. Les DC sécrètent alors de l'IFN $\alpha$ , qui active les cellules de l'immunité innée qui vont induire la lyse des cellules tumorales. Par la suite des TAA sont libérés dans le milieu extracellulaire et vont être internalisés par les DC. Les DC subissent un processus de maturation suite à la capture de ces antigènes et à la réception de signaux de danger. Ce processus de maturation est essentiel pour l'activation des cellules T. L'activation des lymphocytes T cytotoxiques conduit ainsi potentiellement à la lyse spécifique (TCR/CMH-I-peptide dépendant) des cellules tumorales après migration au site tumoral. D'après (El Hage et al., 2008).

#### 2.1. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont été décrites pour la première fois par Ralph Steinman il y a près de trente ans. Ses travaux ont mis en évidence une population de cellules dendritiques dans la rate. Peu après, il est devenu clair que les DC existaient dans tous les tissus lymphoïdes et la plupart des tissus non lymphoïdes. Au cours des années 1970, la plupart des immunologistes considéraient les

macrophages comme les principales CPA. Par rapport aux DC, les macrophages sont plus abondants, sont distribués uniformément dans tout le corps, et sont connus pour avoir des capacités de présentation d'Ag. Il a fallu attendre les années 1980 pour que les DC soient considérées comme des "CPA professionnelles". Alors que la rareté des DC était un obstacle pour les étudier, dans les années 1990, les chercheurs ont appris comment générer un grand nombre de DC à partir des précurseurs CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse ou à partir de monocytes CD14<sup>+</sup> *in vitro* (Lipscomb and Masten, 2002). Les DC sont aujourd'hui considérées, à juste titre, comme des sentinelles de l'immunité permettant d'initier une réponse immunitaires adaptative. En effet, les Ag circulants sont phagocytés par les DC, circulantes ou résidantes dans les ganglions lymphatiques, puis sont apprêtés afin d'être présentés, sous forme de peptides antigéniques aux lymphocytes T naïfs se trouvant dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces lymphocytes T migrent à leur tour vers le site tumoral pour assurer l'éradication potentielle des cellules cancéreuses (**figure 4**).

Les DC immatures ont une forte capacité de phagocytose et expriment faiblement les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et de co-stimulation lymphocytaire (CD40, CD80, CD86) (Banchereau and Steinman, 1998; Hart, 1997). Lors de leur activation, les DC immatures vont subir un processus de maturation suite à la réception de signaux de danger (Hsp, calreticulin, PAMP...) et à la capture d'antigènes tumoraux. Cette maturation va leur permettre d'initier une réponse immune adaptative en stimulant les lymphocytes T naïfs grâce à une augmentation de leur capacité de présentation antigénique, à l'expression de molécules de co-stimulation et à leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires (Gabrilovich, 2004).

Il est important de noter que des antigènes vont être internalisés par les DCs au cours de ce processus et dégradés afin d'être présentés aux lymphocytes T naïfs sous forme de peptides sur le CMH, induisant une réponse immune impliquant à la fois les lymphocytes T-CD4<sup>+</sup> et T-CD8<sup>+</sup>. En ce qui concerne l'immunité antitumorale, la voie la plus probable par laquelle se produit l'activation de la réponse T-CD8<sup>+</sup> spécifique des TAA est celle dite de la "présentation croisée" (ou cross-presentation), qui est une caractéristique propre aux DC correspondant à leur capacité à présenter par la voie des molécules de classe I du CMH des antigènes exogènes. Plusieurs sources de TAA exogènes ont été identifiées et caractérisées, comme par exemple des cellules tumorales nécrotiques, des corps apoptotiques, des peptides chaperonnés par des protéines Hsp ou encore des exosomes libérés par les cellules tumorales (den Haan et al., 2000). Enfin, on distingue 2 principales populations de DC, les mDC (myéloïdes) et les pDC (plasmacytoïdes). Les deux sous-types de DC reconnaissent différents agents pathogènes en exprimant des répertoires distincts de TLR et induisent différents types de réponses immunitaires innées et adaptives en fonction de facteurs environnementaux (Kadowaki, 2009).

#### 2.2. Les lymphocytes T

Les Lymphocytes T (LT) sont les cellules effectrices et régulatrices de la réponse immunitaire. Ils représentent 65 à 80% des lymphocytes circulants. Il a été montré que la présence de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) possède une valeur pronostique prédictive (postive ou négative) pour plusieurs tumeurs solides (de Jong et al., 2009; Tomsova et al., 2008). Parmi les lymphocytes T, on distingue les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (lymphocytes T auxiliaires) et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (lymphocytes T cytotoxiques ou CTL) qui se distinguent par leur mode d'action. Les lymphocytes expriment tous les récepteurs TCR (T Cell Receptor) associés aux molécules CD3 pour la transduction du signal, et des protéines membranaires comme des immunoglobulines, des intégrines (ex. CD103), des sélectines, des récepteurs aux cytokines et d'autres clusters de différenciation.

L'engagement du TCR suite à la reconnaissance du complexe peptide/CMH, l'interaction entre les molécules d'adhésion ICAM1 (intercellular cell adhesion molecule) et LFA1, ainsi que l'interaction entre la molécule de costimulation CD28 et ses ligands B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86)) au niveau de la synapse immunologique aboutissent à l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules T (**figure 5**).



**Figure 5: Représentation schématique de la synapse immunologique entre lymphocyte T et cellule cible.** Cette vue d'ensemble montre une sélection de ligands/recepeurs clés et de molécules de signalisation impliqués dans l'activation des lymphocytes T. En rouge, le complexe peptide/CMH. En bleu, les molécules activatrices/co-stimulatrices. En jaune, les molécules inhibitrices. La flèche indique des signaux qui conduisent à l'activation des lymphocytes T. D'après (Huppa and Davis, 2003).

#### **2.2.1.** Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

La reconnaissance d'Ag spécifiques présentés dans un contexte de CMH de classe II par les CPA conduit à la prolifération des lymphocytes T CD4 (LT CD4<sup>+</sup>) naïfs et en leur différenciation en cellules effectrices initialement définies comme « lymphocytes T helper » (Th) sous les désignations de Th1 et Th2. Cette classification première est fonction de l'implication de ces cellules effectrices dans la réponse immune contre des antigènes intra (Th1) ou extra (Th2) cellulaires et du profil cytokinique qui leur est associé, favoriseraient respectivement une réponse cellulaire ou humorale. L'identification subséquente d'autres lignages a conduit à la révision du paradigme Th1/Th2 et à élargir l'éventail des sous-populations de LT CD4 aux sous-populations T régulatrices (Treg), T helper 17 (Th17) et T follicular helper (Tfh) (Luckheeram et al., 2012). La polarisation des LT CD4 effecteurs en l'un de ces lignages distincts est déterminée au cours de l'activation par des facteurs solubles caractéristiques d'un contexte environnemental donné. Cette polarisation est orchestrée par un panel singulier de facteurs de transcription.

Les LT CD4<sup>+</sup> régulent la réponse immune adaptative suite à l'interaction entre le complexe CMH de classe II/peptide exprimé par la DC et le TCR de la cellule T-CD4<sup>+</sup>, ce qui permet à la DC d'induire l'expression de CD40L sur la cellule T-CD4<sup>+</sup>. L'interaction CD40/CD40L va induire la maturation terminale de la DC, en augmentant son expression de CD80 et CD86, et induire sa sécrétion d'IL-12. Cette stimulation des DC *via* CD40 est ainsi un facteur critique pour rendre les DC pleinement compétentes pour l'activation des cellules T-CD8<sup>+</sup> (Zhu and Paul, 2008). Les cellules T CD4<sup>+</sup> de type Th1 se caractérisent également par la sécrétion d'IL2, d'IL12, d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  qui sont impliqués dans l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et dans l'induction d'une réponse T cytotoxique.

L'orchestration de la réponse immune par les LT CD4 « helper » ne se limite pas aux seules cellules de l'immunité adaptative. Les LT CD4 « helper » Th1 et Th2 ont en effet, la capacité d'activer l'immunité innée anti-tumorale. La sécrétion d'IFNγ par les Th1 favorise le recrutement au sein de la tumeur de macrophages et l'augmentation de leur production d'espèces réactives oxygénées (ROS) et azotées impliquées dans la lyse des cellules tumorales. Les LT CD4 Th2 vont eux permettre le recrutement de polynucléaires éosinophiles (Hung et al., 1998). Par ailleurs, les LT CD4 spécifiques d'Ag pourraient jouer un rôle dans l'initiation de l'activation des cellules NK.
# 2.2.2. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>: les effecteurs clés de la réponse immune anti-tumorale

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (CTL) sont les principaux acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. Ils exercent leur fonction suite à la reconnaisse par leur TCR de fragments antigéniques présentés à la surface des cellules tumorales par les molécules de CMH-I. Pour accomplir leurs fonctions cytotoxiques, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> subissent une différenciation au cours de laquelle ils acquièrent leur fonction cytotoxique et sécrétrice de cytokines comme l'IFN-γ. En effet, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs migrant dans les tissus lymphoïdes, peuvent rencontrer un peptide antigénique présenté spécifiquement par les CPA professionnelles *via* les molécules du CMH-I (figure 4). Dès lors, ils sont activés grâce à l'interaction engageant leur TCR et le complexe CMH-I/peptidique antigénique entraînant alors leur expansion (Kaech et al., 2002). De plus, cette activation conduit à l'acquisition de fonctions cytotoxiques par les CTL. En effet l'induction des gènes impliqués dans la cytotoxicité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (perforine, granzymes...) nécessite non seulement une activation *via* leur TCR, mais également une co-stimulation qui est fortement augmentée par les CPA, les IFN de type I, l'IL-1 et l'IFN-γ. La combinaison de ces signaux conduit à la production d'IL-2 et d'autres cytokines (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21) qui sont nécessaires pour activer l'expression des gènes cytotoxiques.

La majorité des TAA identifiés chez l'homme reconnus par ces lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent être classés en six grandes catégories en fonction de leur profil d'expression et/ou de leur origine (Boon et al., 1997). On retrouve les Ag «cancer-testis» ou CTA, les antigènes d'expression aberrante, les antigènes de différenciation, les antigènes mutés (ex. RAS, CDK4...), les antigènes surexprimés (RAGE...) et les antigènes viraux. Les CTA sont des Ag exprimés spécifiquement par des cellules tumorales et non par les tissus sains, à l'exception des cellules germinales mâles, ou encore des ovaires, de l'utérus et du placenta (ex. MAGE-A/B/C, BAGE, CAGE, NY-ESO-1, LAGE, PAGE, XAGE). En particulier, MAGE-1 code pour un antigène reconnu par des lymphocytes T cytolytiques autologues dans le mélanome (Boon and Lucas, 1996). Les particularités importantes de ces CTA sont leur forte expression dans les cancers et leur fréquence élevée d'expression dans différents types de tumeurs ce qui fait d'eux de bons candidats en vaccination anti-tumorale (Gjerstorff et al., 2015). D'autre part, plusieurs groupes ont tenté d'identifier des antigènes de rejet tumoral potentiels issus de peptides qui sont entièrement absents au niveau des tissus humains normaux, dits « néoantigènes ». De tels néoantigènes sont uniquement créés par des altérations d'ADN spécifiques des tumeurs qui conduisent à la formation de nouvelles séquences de protéines. En comparaison avec les antigènes non mutés, ces néoantigènes sont particulièrement intéressants pour le contrôle des tumeurs, car les cellules T qui sont spécifiques pour ces néoantigènes ne sont pas affectées par la tolérance centrale. En conséquence, les néo-antigènes semblent représenter des cibles idéales pour l'immunothérapie anticancéreuse basée sur les cellules T (Schumacher and Schreiber, 2015).

De plus, on distingue quatre sous-populations différentes de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> : les lymphocytes T naïfs, effecteurs, effecteurs/mémoires et mémoires. Chacune de ces sous-populations se distingue par des propriétés fonctionnelles et phénotypiques différentes leur attribuant des fonctions distinctes. Ce processus de différenciation résulte en un changement de profil d'expression génique qui permettra au lymphocyte T CD8<sup>+</sup> d'acquérir des fonctions différentes (Champagne et al., 2001; Romero et al., 2007; Takata and Takiguchi, 2006). La population de cellules T mémoires circulantes est généralement divisée en deux sous-types: les cellules T effectrices mémoires ( $T_{EM}$ ) et les cellules T centrales mémoires ( $T_{CM}$ ). Ces deux sous-types peuvent être distingués par leur localisation, étant donné que les  $T_{CM}$  se trouvent dans les organes lymphoïdes secondaires et les  $T_{EM}$  circulent dans les tissus non lymphoïdes. Plus récemment, des études ont identifié un troisième sous-type, appelé cellules T mémoires résidant dans les tissus ( $T_{RM}$ ), basées sur leurs propriétés migratoires (Shin and Iwasaki, 2013).

# 2.3. Les cellules tueuses naturelles (Natural Killer ; NK)

# 2.3.1. Historique

L'existence de lymphocytes possédant une capacité cytotoxique spontanée a été découverte par R. Kiessling et R.B. Herberman en 1975 (Kiessling et al., 1975). Il a été en effet isolé un sous-type de lymphocytes à partir des ganglions lymphatiques, de la rate et du sang périphérique de différents modèles murins. Par la suite, il a été montré que durant leur maturation au niveau des souris, ces cellules n'étaient pas capables de réarranger les récepteurs aux antigènes ce qui les différentient des cellules B et T dont la fonction est dépendante de l'interaction TCR/BCR-peptide/CMH qui initie leur fonction. Ces cellules sont capables de tuer des cellules cibles (et notamment tumorales) sans préalable immunisation et sont complètement tolérantes envers les cellules normales de l'hôte. Le terme « Natural Killer » a été choisi par R. Kiessling (Woll et al., 2005).

# 2.3.2. Définition

Les cellules NK sont une des composantes cellulaires majeures du système immunitaire inné et constituent le troisième type de lymphocytes, à côté des lymphocytes B et T. Elles sont présentes dans le sang ainsi que dans de nombreux organes comme le foie, la rate, les poumons, les ganglions lymphatiques, le placenta et les intestins. Ces cellules dérivent d'un précurseur médullaire commun

aux lymphocytes T (Spits et al., 1995). Contrairement aux lymphocytes B et T, les cellules NK se développent normalement dans les souris déficientes pour les gènes de réarrangement des récepteurs de l'antigène (souris SCID et Rag<sup>-/-</sup>). Phénotypiquement, les lymphocytes NK se caractérisent par l'absence des récepteurs spécifiques de l'antigène des lymphocytes B (BCR, B Cell Receptor) et des lymphocytes T (TCR/CD3). Chez l'homme, les cellules NK expriment un récepteur de basse affinité pour le fragment Fc des IgG, appelé CD16 (FcyRIIIA), ainsi qu'une isoforme des molécules d'adhérence du système nerveux, CD56 (neural cell adhesion molécule (NCAM)). La définition des cellules NK est à la fois morphologique, phénotypique et fonctionnelle. Ce sont de grands lymphocytes granulaires (de Villartay et al., 2003). Les cellules NK représentent 5 à 20% des lymphocytes totaux (Cooper et al., 2001). En raison de leur capacité cytotoxique, ils interviennent dans les premières étapes de la réponse immunitaire et jouent un rôle essentiel dans la surveillance immunitaire contre les cellules infectées ou tumorales (Lanier, 2008). Les cellules NK peuvent également sécréter différentes cytokines inflammatoires et possèdent un mécanisme de lyse similaire aux lymphocytes T CD8 qui est dépendant de la présence dans leur cytoplasme de granules cytotoxiques ou de l'expression de ligands permettant l'engagement de la voie dite des récepteurs à domaine de mort (Robertson et al., 1990) (voir chapitre II partie 2.4).

# 2.3.3. Développement et différenciation des cellules NK

Les cellules NK dérivent de cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>. La moelle osseuse est l'organe principal du développement des cellules NK chez les adultes en raison de son microenvironnement riche composé de diverses cytokines, facteurs de croissance et de cellules stromales. Néanmoins, le thymus, les ganglions lymphatiques, le foie et la rate sont également des sites de développement des cellules NK (Di Santo and Vosshenrich, 2006). A travers la perte et l'acquisition séquentielles de certains marqueurs, ce précurseur s'engage dans la lignée NK puis acquiert progressivement les fonctions et le phénotype des cellules NK matures. Un modèle de développement et de différenciation des cellules NK a été proposé par Freud et Caligiuri (figure 6). Ce modèle comporte cinq stades de différenciation basés sur l'expression séquentielle des molécules CD34 (molécule d'adhésion exprimée sur les cellules souches), CD117 (C-kit receptor), CD94, CD16 (Fc gamma RIII) et CD56: stade 1/ pro-NK, stade 2/ pré-NK, stade 3/ iNK (NK immature) et en fin les stades 4 et 5 marqués par l'acquisition de CD56 et correspondant aux NK CD56<sup>bright</sup> et NK CD56<sup>dim</sup> respectivement. Un sixième stade de développement peut être proposé et correspondrait aux cellules « NK mémoire » (figure 6). Cette entité cellulaire et ce concept sont sujets à controverse. Cependant, plusieurs travaux récents suggèrent que les cellules NK sont capables d'acquérir des fonctions mémoires. D'une manière schématique, l'engagement dans la lignée NK se fait progressivement jusqu'au stade 3/ iNK. La maturation fonctionnelle et l'expression du répertoire NK se font d'une manière progressive et ordonnée au cours des stades tardifs de leur développement (entre le stade 3 et 5). Ainsi, CD161 apparait en premier, suivi de CD56, CD94/NKG2A, NKp46, NKG2D, et enfin des récepteurs KIRs (killer cell immunoglobulinlike receptors) et de CD16. L'expression de certains récepteurs, tels que CD56 ou CD94/NKG2A, diminue au cours du stade final du développement NK. L'acquisition de fonctions effectrices telles que la production d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et la cytotoxicité constitue un événement assez tardif dans le développement des cellules NK et s'effectue entre le stade 4 et 5 (Yu et al., 2013).



**Figure 6 : Modèle de développement** *in vivo* **des cellules NK humaines.** Cette figure illustre les différents stades supposés de développement et de maturation des cellules NK humaines à partir d'une cellule souche hématopoïétique. D'après (Yu et al., 2013).

Comme mentionné précédemment, les cellules NK ont été caractérisées par l'expression phénotypique de CD56 et l'absence l'expression de CD3 (Spanholtz et al., 2010). Le niveau d'expression de CD56 à la surface des cellules NK permet leur classification en deux sous-populations fonctionnellement distinctes. Les cellules NK CD56<sup>bright</sup> produisent beaucoup de cytokines mais leur cytotoxicité est moindre. Au contraire, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> qui représentent la majorité des cellules NK (90%), ont une faible densité d'expression de CD56 et un fort taux d'expression du récepteur de type III du fragment Fc $\gamma$  (ou CD16) et sont caractérisées par un très forte activité cytotoxique. En revanche leur production de cytokines immunorégulatrices peut être considérée comme négligeable, même après stimulation (**figure 7**) (Cooper et al., 2001).



**Figure 7: Schéma des sous-types de cellules NK. (a)** les cellules NK CD56<sup>bright</sup> produisent des niveaux élevés de cytokines après stimulation. Ce sous-groupe représente 5 à 10 % des cellules NK du sang périphérique et exprime faiblement CD16, ce qui explique leur faible activité cytotoxique et la faible cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) comparé aux cellules NK CD56<sup>dim</sup>. Ce sous-type exprime fortement le récepteur inhibiteur NKG2A/CD94 et le récepteur lectine de type-C (NKR), mais possède un faible niveau d'expression des récepteurs Ig-like (KIR). Ils expriment constitutivement un certain nombre de récepteurs de cytokines et de chimiokines, comme le récepteur à l'IL2 (IL-2Raßy), c-kit et le récepteur de la chimiokine 7 (CCR7). Les cellules NK CD56<sup>bright</sup> expriment également la molécule d'adhérence L-sélectine, qui, en combinaison avec CCR7 est impliquée dans le trafic vers les ganglions lymphatiques secondaires. (b) En revanche, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> représentent environ 90 % des cellules NK du sang périphérique et produisent des niveaux faibles de cytokines mais sont de puissants médiateurs de l'ADCC, de l'activité LAK (lymphokine-activated killer) et de la cytotoxicité naturelle et ont une morphologie plus granulaire. Le sous-type CD56<sup>dim</sup> a un haut niveau d'expression de KIR. Ces cellules expriment de manière distincte des récepteurs de cytokines (ex. IL-2R&9) et des chimiokines (ex. CXCR1 et CX3CR1) et n'expriment pas la L-sélectine, mais expriment fortement le P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1). D'après (Cooper et al., 2001).

# 2.3.4. Education des cellules NK: la tolérance du soi

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les différents aspects de l'éducation des cellules NK par les molécules du CMH de classe I. En dépit du fait que chaque modèle possède des caractéristiques uniques, ils partagent également diverses fonctionnalités clés (Joncker and Raulet, 2008; Yokoyama and Kim, 2006). A l'heure actuelle, le modèle qui prévaut pour expliquer l'éducation des cellules NK et leur tolérance au soi est dénommé « théorie du licencing ». Ce modèle propose qu'une cellule NK doit s'engager avec le CMH-I du soi au cours de son développement afin de pouvoir s'activer grâce à des stimuli ultérieurs, cette condition étant appelée "licencing" (Hoglund and Brodin, 2010). Cette selection est d'autre part essentielle pour éliminer les cellules NK autoréactives. Malgré celà, des cellules NK qui n'ont pas été en contact avec le CMH-I, définies comme «unlicenced», peuvent subsister. En effet, environ 10% de cellules NK CD56<sup>dim</sup> (unlicenced) n'expriment pas de récepteurs NKG2A ou KIR spécifiques du CMH-I du soi. Ces cellules NK KIR<sup>-</sup> NKG2A<sup>-</sup> qui ont été isolées à partir du sang périphérique après stimulation

par les cellules leucémiques K562, expriment un niveau inférieur de CD107a à la membrane et un niveau deux fois plus faible d'IFN- $\gamma$  par rapport aux cellules NK KIR<sup>+</sup> NKG2A<sup>+</sup>, démontrant qu'elles possèdent des activités sécrétoires et cytotoxiques moindres (Anfossi et al., 2006).

## 2.3.5. Activation des cellules NK

Les cellules NK sont équipées d'un ensemble de récepteurs qui peuvent soit stimuler la réactivité des cellules NK (récepteurs activateurs) ou diminuer leur réactivité (récepteurs inhibiteurs). Ces récepteurs exercent leur fonction (inhibitrice ou activatrice) lorsqu'ils reconnaissent leurs ligands sur les cellules cibles (notamment tumorales). L'intégration de la somme des signaux activateurs et inhibiteurs transmis par ces récepteurs suite à leur interaction avec des molécules de surface des cellules tumorales régule l'état d'activation de la cellule NK (**figure 8**). En effet, la balance de ces signaux détermine si la cellule NK va exercer ou non ses fonctions de cytotoxicité et/ou de sécrétion de cytokines vis-à-vis de la cellule cible (Bryceson et al., 2006; Vivier et al., 2004).



**Figure 8: Les principaux récepteurs des cellules NK**. La transition des cellules NK de l'état non activé à un état activé est induite par un réseau de récepteurs activateurs et inhibiteurs et l'intégration des signaux d'activation et d'inhibition détermine l'état des cellules NK. D'après (Chester et al., 2015).

Les récepteurs activateurs comprennent aussi des récepteurs qui interagissent avec des ligands solubles tels que des cytokines. Des récepteurs de cytokines qui sont couplés à la chaîne commune gamma ( $\delta c$ ), tels que l'IL-2R, l'IL-15R, IL-21R, sont impliqués dans l'activation des cellules NK et leur acquisition de fonctions effectrices. En effet, L'IL2 et l'IL-15 sont nécessaires pour la prolifération des cellules NK (Caligiuri, 2008). Des récepteurs de cytokines qui sont liés à la protéine adaptatrice MyD88 (Myeloid differenciation primary response gene 88) sont également

importants pour la maturation des cellules NK, à savoir IL-1R chez l'homme (Hughes et al., 2010) et l'IL-18R chez la souris (Chaix et al., 2008).

## 2.3.5.1. Les récepteurs activateurs

Les lymphocytes T et B possèdent un seul récepteur antigénique qui domine leur développement et leur activation. Les signaux engendrés par ces récepteurs antigéniques sont augmentés par des molécules de co-stimulation. En revanche, les cellules NK ne possèdent pas de récepteur dominant, mais s'appuient plutôt sur une combinaison de récepteurs pour initier des fonctions effectrices. Outre l'expression des molécules de CMH de classe I par les cellules tumorales, les cellules NK surveillent l'expression des ligands de leurs récepteurs activateurs à la surface des cellules cibles. Même si l'expression des molécules du CMH de classe I est normale, l'apparition ou la surexpression de ces ligands bouleverse l'équilibre des signaux activateurs/inhibiteurs, et conduit à l'activation des cellules NK (Lanier, 2008). Les cellules NK possèdent un ensemble de récepteurs activateurs dont certains sont détaillés ci-dessous.

# 1. Le récepteur NKG2D (Natural-Killer Group2, member D)

## a) Structure, signalisation, et rôle de NKG2D dans l'immunité antitumorale

Le récepteur NKG2D joue un rôle important dans la réponse immune anti-tumorale et par conséquent a été largement étudié. La plupart des cellules NK (ainsi que des cellules T CD8<sup>+</sup>, et dans certaines conditions les cellules CD4<sup>+</sup>) expriment ce récepteur. NKG2D est un récepteur activateur codé par un gène localisé au niveau du chromosome 12. Ce récepteur a très peu d'homologie avec les autres membres de la famille NKG2 (Nausch and Cerwenka, 2008). NKG2D est une glycoprotéine transmembranaire de type II, de la famille des lectines de type-C, qui agit comme un homodimère et est associée à la protéine adaptatrice DAP12 ou DAP10 au niveau des cellules NK ou des cellules T CD8<sup>+</sup> respectivement. L'association de NKG2D avec la protéine adaptatrice DAP12 au niveau des cellules NK conduit à phosphorylation d'ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif) et déclenche la cascade de signalisation Syk et/ou Zap70 (Zetachain associated protein kinase 70). En revanche, au niveau des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, l'association avec la protéine adaptatrice DAP10 suite à l'engagement de NKG2D avec son ligand, conduit à la phosphorylation de la tyrosine au niveau du motif YINM, au recrutement de la proteine PI3K (phosphoinositide 3-kinase) ou la protéine Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) et active par la suite différentes voies de signalisation. Il est également important de noter que le récepteur NKG2D exprimé par les cellules T CD8<sup>+</sup> induit un signal de co-stimulation participant à leur activation qui nécéssite le TCR (figure 9) (Slavuljica et al., 2011).



**Figure 9: NKG2D agit comme un récepteur activateur et de co-stimulation**. NKG2D est un homodimère transmembranaire de type 2 qui induit la signalisation *via* l'association avec les molécules adaptatrices DAP10 ou DAP12. Au niveau des cellules NK, l'association avec DAP12 conduit à la phosphorylation des motifs ITAM de cette dernière et déclenche la cascade de signalisation Syk et/ou Zap70. Le récepteur NKG2D sur les cellules NK sert de signal d'activation et son engagement avec son ligand est suffisante pour déclencher la cytotoxicité et la production de cytokines induites par les cellules NK. Au niveau des cellules T CD8<sup>+</sup>, l'association avec DAP10 conduit à la phosphorylation de tyrosine au niveau du motif YINM et le recrutement de PI3K et Grb2. NKG2D sur les cellules T CD8<sup>+</sup> agit comme un récepteur co-stimulateur et nécéssite le TCR pour l'activation complète des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. D'après (Slavuljica et al., 2011).

Il a été bien démontré que les cellules NK à travers l'engagement du récepteur NKG2D, peuvent éliminer les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Deguine et al., 2012; Nausch and Cerwenka, 2008) et que le polymorphisme du gène qui code pour la protéine NKG2D est corrélé à une sensibilité aux cancers. En effet, les allèles avec une forte activité (HNK1) sont plus protecteurs comparés aux allèles avec une faible activité (LNK1) (Hayashi et al., 2006; Imai et al., 2012). L'expression de NKG2D peut être régulée par les cytokines du microenvironnement. Par exemple, l'IL-15 ou le TNF-α augmentent l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK contrairement au TGF-β qui la diminue (Crane et al., 2010).

#### b) Les ligands de NKG2D

Le récepteur NKG2D possède plusieurs ligands (NKG2DLs), qui sont des membres éloignés de la famille du CMH de classe I. Chez l'homme, NKG2D est un récepteur pour les molécules MIC

(MHC class I chain-related protein), à savoir MICA et MICB, et ULBP (HCMV UL16-binding proteins), notamment UBLP1-6 (**figure 10**) (Cosman et al., 2001). Ces ligands de NKG2D sont exprimés de manière restreinte par les cellules saines pour éviter une auto-immunité, mais sont fréquemment surexprimés dans les cellules infectées et transformées, agissant ainsi comme un signal de danger favorisant l'élimination des cellules tumorales (Bacon et al., 2004; Chalupny et al., 2003; Radosavljevic et al., 2002).



**Figure 10: Les deux familles génétiques des ligands des récepteurs NKG2D.** Les ligands de NKG2D appartiennent à deux familles génétiques présentes au niveau de différents bras du chromosome 6. Les ligands MICA/B sont hautement polymorphiques contrairement aux ULBPs. D'après (Fernandez-Messina et al., 2012).

Les mécanismes régulant les gènes qui codent pour ces ligands du récepteur NKG2D connus à l'heure actuelle et susceptibles de modifier l'expression de ces ligands sont représentés dans la table 3. Par exemple les dommages à l'ADN ou le stress oxydatif induisent l'expression des ligands MICA/B et ULBP1-4.

Voie de signalisation	Modèle cellulaire	Ligands de NKG2D		
Voies de stress				
Dommages à l'ADN	Lignées de cellules de myelome Ligands humains et murins			
Stress thermique	Lignées de cellules épithéliales MICA/B			
Stress oxydatif	Lignées de cellules épithéliales bronchiques MICA/B, ULBP1-4			
Voies de prolifération/oncogènes				
c-Myc	Lymphome primaire Rae-1ɛ			
H-RasV12	Lignées de cellules humaines et murines Rae-1a, Rae-1b, ULBP1			
HER2/HER3	Lignées de cellules de cancer du sein	MICA/B		
BCR-ABL	Cellules LMC MICA/B			
PI3K	Multiples	Ligands humains et murins		
Suppresseurs de tumeur				
P53	Lignées de cellules épithéliales ULBP1,2			
Progression tumorale et métastases				
EMT	Lignées de cellules épithéliales MICA/B, ULBP1-3			

 Table 3: Voies de signalisations majeures régulant l'expression des ligands de NKG2D. Rae-1 (Retinoic acid early inducible 1) : ligands murins de NKG2D. D'après (Huergo-Zapico et al., 2014).

Finalement, la présence de ligands solubles de NKG2D dans le sérum des patients atteints de cancer et l'engagement persistant des récepteurs NKG2D ont été liés à une altération des fonctions cytotoxiques médiée par les récepteurs NKG2D (Salih et al., 2008). Ainsi, les mécanismes sousjacents de la libération des ligands de NKG2D ont été largement étudiés ces dernières années et des similitudes et différences entre les ligands de NKG2D qui ne correspondent pas à la même famille génétique ont été observées. Par exemple, les molécules MICA avec un long domaine transmembranaire (Salih et al., 2002), MICB (Boutet et al., 2009), et ULBP2 (Waldhauer and Steinle, 2006) sont clivés après protéolyse par des métalloprotéinases sécrétées par les cellules tumorales, alors que MICA\*008 avec un court domaine transmembranaire et les molécules ULBP3 sont libérées en tant que protéines avec une forme entière et localisées dans des exosomes (Ashiru et al., 2010; Fernandez-Messina et al., 2010).

# 2. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCRs)

Les récepteurs NCR sont constitués de quatre récepteurs activateurs: NKp30, NKp44, NKp46 et NKp80 (qui est moins bien connu). NKp30, NKp44 et NKp46 sont des membres de la super famille des immunoglobulines et NKp80 est un membre des lectines de type-C (Biassoni et al., 2001; Koch et al., 2013). Les NCR jouent un rôle important dans l'activité anti-tumorale des cellules NK et leur diminution d'expression a été détectée dans différentes pathologies associées à des fonctions altérées des cellules NK. Presque toutes les cellules NK expriment NKp30 et NKp46 tandis que seules les cellules NK activées par l'IL- 2 et un sous-type de lymphocytes T expriment NKp44 (Vitale et al., 1998). En revanche, les ligands de ces récepteurs n'ont pas encore été clairement identifiés.

NKp46 est une glycoprotéine de 46 KDa avec un domaine transmembranaire qui interagit avec CD3-ζ et transfère un signal d'activation dû à son domaine ITAM. La transmission du signal mobilise le calcium dans les cellules NK et active par conséquent leur activité cytotoxique et leur production de cytokines (Moretta and Moretta, 2004). NKp46 est d'ailleurs un meilleur marqueur que CD56 pour identifier ces cellules NK (Walzer et al., 2007).

NKp30 est une glycoprotéine de 30 KDa dont l'expression à la surface des cellules NK est corrélée avec celle de NKp46, qui s'associe à CD3- $\zeta$  et FccRI- $\gamma$  et coopère avec d'autres NCR pour l'activation des cellules NK et favorise leur activité cytotoxique (Moretta and Moretta, 2004). NKp30 est également impliqué dans la communication entre cellules dendritiques et cellules NK (Reschner et al., 2008). NKp44 est une glycoprotéine de 44 KDa. L'expression de ce récepteur est limitée aux cellules NK activées capables d'initier une réponse cytotoxique immédiate. La liaison de ce récepteur avec son ligand conduit à la libération de granules cytotoxiques, d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  et par conséquent à une augmentation de la lyse de nombreuses lignées de cellules tumorales par les cellules NK (Horton and Mathew, 2015).

### 3. Le récepteur DNAM-1

Le récepteur DNAM-1 (CD226) (DNAX accessory molecule-1) est une molécule d'adhésion constitutivement exprimée à la surface des cellules NK, des lymphocytes T, des cellules dendritiques et des macrophages (Zingoni et al., 2012). Les ligands des DNAM-1 sont CD112 (également connu sous le nom de nectine 2 ou PVRL2) et CD155 (connu sous le nom de PVR) (Bottino et al., 2003). Les cellules tumorales expriment ces ligands qui pourraient augmenter la cytotoxicité des NK *in vitro*. Ainsi, des études récentes ont montré une activité anti-tumorale réduite des cellules NK chez les souris *knock-out* pour DNAM-1 (Lakshmikanth et al., 2009).

## 4. Le récepteur CD16

Les cellules NK ainsi que d'autres cellules (les LT, les monocytes et les macrophages) expriment le récepteur CD16 (Ancuta et al., 2006; Ziegler-Heitbrock, 2007). CD16 existe sous une forme transmembranaire (FcyRIIIA) et une forme fixe avec un ancrage membranaire de type glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) à la surface des neutrophiles (FcyRIIIb) (Williams et al., 2000). Le récepteur CD16 a un rôle important dans la liaison entre l'immunité innée et adaptative connue sous le nom de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ou ADCC) qui est un mécanisme de destruction des cellules tumorales après opsonisation par des anticorps (Lanier, 2005). Il est le seul récepteur, capable de stimuler les cellules NK au repos sans signal supplémentaire (Bambard et al., 2010).

#### 5. Les KIR activateurs

Les KIR activateurs diffèrent des KIR inhibiteurs par la présence de petites queues cytoplasmiques. Ils possèdent une partie transmembranaire qui contient une charge d'acides aminés qui permet l'interaction de protéines adaptatrices avec des motifs ITAM (Srivastava et al., 2003). Les KIR activateurs reconnaissent les molécules de CMH-I non classiques avec une affinité dix fois supérieur à celle des KIR inhibiteurs. Il existe plusieurs couples de KIR activateurs/ligands que je ne vais pas détailler. Néanmoins, il convient de noter que KIR2DL4 (qui reconnait HLA-G) peut délivrer à la fois un signal inhibiteur à travers son domaine intracellulaire ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) et également un signal activateur en recrutant KARAP/DAP12 avec un domaine ITAM (Miah et al., 2008).

# 2.3.5.2. Les récepteurs inhibiteurs

Les cellules NK expriment un répertoire de récepteurs inhibiteurs qui régulent négativement leur activation. Certains récepteurs inhibiteurs sont spécifiques du CMH de classe I, tandis que d'autres lient des ligands de type « non-CMH ». Certains de ces récepteurs inhibiteurs des NK, tels que les KIR et les LILR (leukocyte immunoglobulin-like receptors), sont des glycoprotéines monomériques de type I de la superfamille des immunoglobulines, alors que d'autres, comme les récepteurs Ly49 et CD94/NKG2A, sont des glycoprotéines de type II de type lectine. Bien qu'ils se différencient dans leurs domaines extracellulaires, ces récepteurs inhibiteurs des NK ont un motif de signalisation commun dans leurs régions cytoplasmiques, appelé motif ITIM (Lanier, 2008). Je vais détailler ici et brièvement les récepteurs KIR inhibiteurs et les récepteurs apparentés aux lectines de type C.

# 1. Les récepteurs KIR inhibiteurs

Les cellules NK (et les cellules T mémoires) expriment ces récepteurs qui sont codés par une douzaine de gènes complexes mais avec une expression combinatoire plus diversifiée. Ainsi, chaque cellule NK d'un individu n'exprime qu'une fraction des KIR avec un niveau de combinaison différent. Les KIR sont une famille de récepteurs dont la nomenclature est basée sur le nombre de domaines d'immunoglobuline extracellulaires (2D ou 3D) suivie de la lettre L (Long) pour ceux qui ont des queues cytoplasmiques (Borrego et al., 2002). La queue cytoplasmique contient un ou deux ITIM qui recrute(nt) des phosphatases comprenant la phosphatase contenant un domaine de la région 2 d'homologie Src (SHP-1) et SHP-2 qui inhibent l'activité lytique des NK et la production de cytokines. Ces différents KIR reconnaissent différentes molécules du CMH-I et distinguent même les différents allèles (Lanier, 2005). La diversité de l'expression des KIRs est acquise au cours du développement des cellules NK, le niveau d'expression et le pourcentage de cellules positives restent stable chez un individu (Shilling et al., 2003).

# 2. Les récepteurs apparentés aux lectines de type C: récepteurs CD94/NKG2

Ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules NK sous la forme d'hétérodimères composés de 2 lectines de type C. Ils reconnaissent les molécules non conventionnelles du CMH-I correspondant à Qa-1<sup>b</sup> chez la souris et HLA-E chez l'homme. La molécule CD94 est une sousunité invariante qui se lie de façon covalente avec chacune des sous-unités codées par un gène de la famille NKG2. Le gène codant pour la molécule CD94 ne présente pas ou peu de polymorphisme allélique (Chang et al., 1995), alors que la famille NKG2 comprend quatre gènes NKG2A, NKG2C, NKG2E (et son variant NKG2H) et NKG2D/F codant pour différentes protéines. NKG2A et NKG2B (qui est un variant de la protéine NKG2A) sont des récepteurs inhibiteurs alors que NKG2C et NKG2E sont des récepteurs activateurs (Lanier, 2005)

# 2.3.6. Les cytokines et les chimiokines secrétées par les cellules NK

Selon le stimulus du microenvironnement, les cellules NK sont capables de sécréter rapidement de multiples cytokines avec diverses fonctions telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , la lymphotoxine alpha (LT- $\alpha$ ), l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10 et l'IL-13 (Reefman et al., 2010). Ces cytokines peuvent agir directement sur les cellules tumorales, ou indirectement sur d'autres populations immunitaires. Par exemple, l'IFN- $\gamma$  produit par les cellules NK peut moduler non seulement la réponse immune antitumorale innée en favorisant l'activation des macrophages (phagocytose), et en favorisant la maturation des cellules dendritiques mais aussi la réponse adaptative en favorisant la polarisation des cellules T CD4<sup>+</sup> vers la voie Th1 (Harizi, 2013; Schroder et al., 2004).

Les cellules NK sont également capables de produire différentes chimiokines telles que MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$  (macrophage inflammatory protein 1), RANTES (CCL5) et IP10 (Fauriat et al., 2010) qui participent à l'attraction de différents types cellulaires au niveau des sites inflammatoires et à la génération d'une réponse immunitaire spécifique de l'antigène (Rot et al., 1992). En effet, les cellules NK du sang périphérique au repos peuvent produire du CCL4, CCL5 et CCL22 sans aucune stimulation mais la stimulation *in vitro* de ces cellules NK augmente leur production de CCL4, CCL5, CCL22 et CXCL8, suggérant que les cellules NK activées peuvent attirer des cellules T, des cellules B, d'autres cellules NK et des neutrophiles vers le site tumoral. De la même manière, il a été montré que les cellules NK stimulées avec de l'IL-2 activent la chimiotaxie d'autres cellules NK (Robertson, 2002).

# 2.3.7. Implication des cellules NK dans la réponse immunitaire dirigée contre le mélanome

Il est bien documenté que le mélanome est une tumeur immunogène et l'interface entre la réponse immunitaire et le mélanome représente une tentative par l'hôte pour supprimer la croissance tumorale. Les cellules NK peuvent participer à la réponse immunitaire précoce contre le mélanome et contribuer à la réponse immunitaire adaptative par la sécrétion de cytokines. En effet, de nombreuses études suggèrent l'implication des cellules NK dans la réponse immune contre le mélanome. Par exemple, la lyse de lignées cellulaires de mélanome est diminuée en présence d'anticorps bloquants NKp30, NKp44 ou NKp46 (Pende et al., 1999; Sivori et al., 1999). Des expériences ont montré que les souris déficientes en NKp46 développent plus de métastases pulmonaires après injection intraveineuse de lignées cellulaires de mélanome, ce qui met en évidence le rôle de ces NCR dans le contrôle de la progression tumorale (Lakshmikanth et al., 2009). DNAM-1 et NKG2D sont des récepteurs clés dans la reconnaissance des cellules de mélanome (Carrega et al., 2009; Casado et al., 2009). En effet, des études ont montré que les souris déficientes en NKG2D ou DNAM-1 ne peuvent pas contenir la croissance de mélanome induite par le méthylcholanthrène (Guerra et al., 2008; Iguchi-Manaka et al., 2008). De plus, différents ligands de NKG2D sont exprimés à la surface de lignées cellulaires de mélanome dérivés de tissus à différents stades (Fuertes et al., 2008; Pende et al., 2002; Schwinn et al., 2009; Vetter et al., 2002). Cependant, même si les cellules de mélanome sont souvent reconnues efficacement et tuées par les cellules NK *in vitro*, les mélanomes ont développé plusieurs stratégies élaborées pour échapper à la destruction induite par les cellules NK *in vivo* (Burke et al., 2010; Tarazona et al., 2015).

# 2.3.8. L'immunothérapie basée sur les cellules NK

Les cancers développent des mécanismes d'échappement aux cellules NK ou induisent l'apparition de cellules NK défectueuses. L'immunothérapie anti-tumorale actuelle basée sur les cellules NK vise à surmonter ces mécanismes d'échappement immunitaires en utilisant plusieurs approches (Cheng et al., 2013).

## 2.3.8.1. Les cellules NK autologues

Les premières études ont tenté d'augmenter la capacité cytotoxique des cellules NK en stimulant les cellules NK endogènes et en augmentant leur prolifération chez les patients par l'administration de différentes cytokines telles que l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, l'IL-21 et l'IFN-a. Bien que l'administration systémique améliore la fonction lytique des NK par différents mécanismes, seulement une activité anti-tumorale limitée a été observée chez des patients cancéreux. Une étude de transfert adoptif de cellules LAK (Lymphokine-activated killers cells) avec des doses élevées d'IL-2 a montré peu d'effets cliniques (Cheng et al., 2013). De plus, les doses élevées d'IL-2 améliorent également l'expansion de lymphocytes T régulateurs et par conséquent diminuent l'activité des cellules NK, conduisant à la mort cellulaire induite par activation des cellules NK (AICD). Dans une autre étude, des doses élevées d'IL-2 ont été remplacées par l'administration quotidienne de faibles doses de cytokines, mais les résultats ont eu un succès limité. L'administration d'autres cytokines comme l'IL-12, l'IL-15 ou l'IL-18 a montré des résultats satisfaisants dans des essais précliniques dans le cadre de diverses stratégies de vaccination. Il a été démontré que la combinaison d'hydrocortisone (HC) et d'IL-15, améliore l'expansion des cellules NK du sang périphérique. Cette combinaison montre son efficacité contre les métastases de poumon dans des modèles murins, mais des doses très élevées d'IL-15 sont nécessaires pour des résultats détectables. La culture de cellules NK en présence d'IL-15 et d'HC améliore la production de cytokines, cependant les cellules conservent le même niveau de cytotoxicité. Bien que dans différentes pathologies, le transfert adoptif de cellules effectrices autologues activées ex vivo ait montré de bons résultats sans effets secondaires contrairement à l'administration de cytokines,

plusieurs autres études ont soulevé quelques questions quant à l'efficacité et aux capacités cytotoxiques de ces cellules NK contre les cellules cancéreuses. Les cancers de stade avancé et l'expression du CMH-I à la surface des cellules tumorales sont des raisons qui peuvent expliquer l'inefficacité de l'administration de NK autologues (Cheng et al., 2013).

## 2.3.8.2. Les cellules NK allogéniques

Les cellules NK allogéniques ont montré plus d'efficacité en immunothérapie anti-tumorale des leucémies, représentant une thérapie avec un minimum de toxicité. Ces cellules NK peuvent également proliférer chez les patients atteints de diverses tumeurs malignes, notamment le mélanome métastatique, le carcinome à cellules rénales, la maladie de Hodgkin et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) de mauvais pronostic (Miller et al., 2005). Le transfert adoptif de cellules NK allogéniques activées en présence d'IL-15/HC in vitro a montré des résultats potentiellement efficaces dans un essai clinique de phase I lorsque ces NK allogéniques sont transférées en combinaison avec un traitement de chimiothérapie standard chez les patients atteints de cancer de poumon non à petites cellules avancé (Iliopoulou et al., 2010). De plus, il a été récemment démontré que les cellules NK syngéniques de souris, les cellules NK humaines autologues et les cellules NK allogéniques provenant de donneurs sains ont la capacité intrinsèque de cibler les cellules de mélanome malin (Lakshmikanth et al., 2009). De manière intéressante, les NCRs et DNAM-1 ont émergé comme des récepteurs clés dans la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules de mélanome, ce qui indique que les NK exprimant ces récepteurs pourraient être de bons candidats pour le transfert adoptif chez les patients atteints de mélanome (Burke et al., 2010). L'inconvénient de cette approche thérapeutique est que l'utilisation des cellules NK allogéniques incompatibles conduit à un rejet immunitaire par incompatibilité de CMH (Lundqvist et al., 2007).

# 2.3.8.3. Les lignées de cellules NK

En raison de leur facilité d'entretien et d'expansion *in vitro*, ainsi que de leur activité anti-tumorale, les lignées de cellules NK représentent un élément thérapeutique altérnatif dans l'immunothérapie du cancer. La capacité anti-tumorale et l'innocuité des cellules NK92 ont été démontrées chez des patients atteints de carcinomes à cellules rénales ou de mélanome dans les essais de phase I. Ces cellules NK sont la seule lignée de cellules NK ayant obtenu l'approbation de la FDA pour les essais cliniques. La capacité cytotoxique des autres lignées de cellules NK telles que KHYG-1, NKL et NKG a été également bien étudiée. Il a été ainsi montré que les cellules KHYG-1 irradiées gardent leur même niveau de cytotoxicité et peuvent être des candidates utiles dans des protocoles d'immunothérapie anticancéreuse. Les transferts adoptifs réussis de cellules NKG contre des

cellules tumorales humaines ont été récemment démontrés dans des modèles de xénogreffe de souris (Cheng et al., 2013).

# 2.4. Mécanismes de cytotoxicité des effecteurs cytotoxiques

Différentes études *in vitro* ont montré que les effecteurs du système immunitaire (CTL et cellules NK) sont capables de détruire leurs cellules cibles en quelques minutes, même si les études *in vivo* suggèrent que le temps nécessaire à la destruction des cellules cibles est plus long (Bossi et al., 2002). La formation de conjugués entre les cellules tumorales et les cellules effectrices ainsi que la formation d'une synapse immunologique dite « lytique » permet aux cellules NK et aux CTL de délivrer les signaux induisant la mort par deux voies principales : (1) la voie d'exocytose des granules cytotoxiques (encore appelée voie perforine et granzymes) et (2) la voie des récepteurs à domaine de mort (**figure 11**).



**Figure 11:** Les deux voies d'apoptose induites par les cellules effectrices. Les CTL utilisent deux types de mécanismes de cytotoxicité pour tuer leur cellule cible spécifique : l'engagement de récepteurs de mort (Fas, TNFRI, DR4, DR5) exprimés à la surface de la cellule cible, et l'exocytose du contenu de granules cytotoxiques (Perforine, Granzymes). Les cellules NK utilisent des mécanismes de cytotoxicité similaires. D'après Dorothée G. *et al*, Hématologie, 2004.

# 2.4.1. La voie perforine/granzymes

Les cellules NK et CTL induisent l'apoptose de leurs cellules cibles par la libération de médiateurs cytotoxiques grâce à l'exocytose du contenu de granules cytotoxiques présents dans leur cytoplasme au niveau de la synapse immunologique formée avec leur cellules cibles (Lieberman, 2003). Les granules cytotoxiques sont des lysosomes sécrétoires complexes qui contiennent à la fois des

protéines lysosomales (i.e. CD107/Lamp1) et des molécules effectrices responsables de l'élimination des cellules cibles (Krzewski and Coligan, 2012), notamment la perforine (PFN) et une famille de sérine-protéases très spécifiques, connues sous le nom de granzymes (Gzms) (Rousalova and Krepela, 2010; Thiery and Lieberman, 2014).

La PFN est une protéine formant des pores en présence de Ca<sup>2+</sup> dans les membranes riches en cholestérol. Elle est exprimée uniquement par les cellules tueuses et est impliquée dans la l'internalisation des Gzms dans le cytoplasme de la cellule cible (Thiery et al., 2011; Thiery and Lieberman, 2014). Chez l'homme, cinq Gzms ont été identifiés (Gzm A, B, H, K et M). Une fois dans les cellules cibles, ces Gzms activent indépendamment plusieurs voies d'apoptose par le clivage de protéines cibles spécifiques situées dans le cytoplasme, les mitochondries et/ou le noyau, où de nombreux substrats protéiques clés des Gzms résidents (Anthony et al., 2010). Le GzmB est l'un des principaux médiateurs de la mort cellulaire médiée par la voie des granules cytotoxiques et est le Gzm le plus largement étudié (Rousalova and Krepela, 2010). Les mécanismes d'action des autres granzymes, dits Gzms «orphelins», sont moins connus, même si plusieurs substrats ont été identifiés au cours des dernières années (Bovenschen and Kummer, 2010).

Le GzmB humain (hGzmB) induit préférentiellement l'apoptose des cellules cibles d'une manière dépendante des mitochondries, par un processus hautement régulé qui implique les protéines de la famille Bcl-2. Le GzmB clive un membre de la famille pro-apoptotique de Bcl-2, nommé Bid (Heibein et al., 2000; Sutton et al., 2000). La forme tronquée de Bid (ou tBid), perturbe la membrane mitochondriale externe d'une manière Bax et/ou Bak dépendante, induisant la perméabilisation de cette membrane mitochondriale externe (MOMP), la libération de facteurs proapoptotiques tels que le cytochrome c, HtrA2/Omi et Smac/Diablo, conduisant à l'activation de la procaspase-9 dans un complexe appelé « apoptosome » suivie de l'activation de la caspase-3 qui va induire le clivage de l'inhibiteur de la DNase activée par la caspase (ICAD) pour libérer la DNase activée par la caspase (CAD) et par conséquent la fragmentation de l'ADN (Wang et al., 2001). Le GzmB peut également cliver directement ICAD pour libérer CAD et induire l'apoptose des cellules cibles (Chowdhury and Lieberman, 2008) (figure 12). Le GzmB peut également induire la mort cellulaire de manière dépendante des ROS (Reactive Oxygen Species). En effet, le GzmB induit une augmentation de la production de ROS dans la cellule cible en attaquant directement plusieurs sousunités de la chaine de transport d'électron, ce qui conduit à la production mitocentrique de ROS, qui est nécessaire pour la libération de facteurs apoptogéniques des mitochondries en réponse au GzmB (Jacquemin et al., 2015). Cette voie est bloquée par la surexpression de la famille de protéines antiapoptotiques Bcl-2, notamment Bcl-2 ou Bcl-xL (Pinkoski et al., 2001). Il a aussi été montré que le GzmB humain peut induire directement l'activation des caspases effectrices, mais ne peut pas cliver la pro-caspase-3 sans la libération de Smac/Diablo et HtrA2/Omi qui facilitent l'activation de la caspase-3 en bloquant l'action inhibitrice des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) (Sutton et al., 2003).

De plus, il a été décrit dans notre équipe une relation entre la protéine suppresseur de tumeur p53 et l'apoptose induite par le GzmB humain. En effet, les cellules tueuses et le GzmB humain induisent une stabilisation rapide et une activation de p53 dans les cellules cibles (Meslin et al., 2007). Plus récemment, les travaux de notre équipe ont montré que p53 activé par le GzmB humain migre vers la membrane mitochondriale externe de la cellule cible et interagit avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Ben Safta et al., 2015) afin de faciliter l'apoptose induite par cette voie (voir article et review en annexe 3 et 4).



**Figure 12: La voie d'apoptose induite par le granzyme B.** Le GzmB peut déclencher la mort cellulaire en clivant la protéine Bid. tBid favorise l'oligomérisation de Bax et/ou Bak dans la membrane externe mitochondriale (qui peut être inhibée par la protéine anti-apoptotique Bcl-2), conduisant à la libération de cytochrome c et la formation de l'apoptosome, suivie de l'activation de la caspase 3 et le clivage de différents substrats comprenant ICAD, l'inhibiteur de l'endonucléase CAD. Le GzmB peut également cliver directement la procaspase 3 ou ICAD et induit une production mitocentrique de ROS pour favoriser l'apoptose. Le GzmB humain opère préférentiellement par la voie Bid/mitochondriale, alors que le GzmB de souris induit l'activation directe de la caspase 3. D'après (Thiery et al., 2015).

## 2.4.2. La voie des récepteurs à domaine de mort

Bien que la voie perforine/granzymes soit la voie principale pour l'induction d'apoptose des cellules cibles par les effecteurs NK et CTL, la voie de récepteurs à domaine de mort peut participer au processus de lyse à travers différents récepteurs de la superfamille du récepteur de type I au TNF, à savoir FAS (CD95/APO-1), le récepteur I de TNF (TNF-R1/p55/CD120a), les récepteurs à TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5 (Wilson et al., 2009). Ces récepteurs de mort sont activés par leurs ligands respectifs: Fas ligand (FasL / CD95L), TNF- $\alpha$  et TRAIL (Ashkenazi and Salvesen, 2014). Ces ligands sont exprimés sous forme de protéines transmembranaires de type 2 homotrimériques à la surface des cellules tueuses activées, mais peuvent également être libérés sous forme de ligands solubles par l'action de protéases de surface cellulaire spécifiques (Ehrlich et al., 2003; Mohan et al., 2002).

La liaison des récepteurs FAS, DR4 et DR5 avec leurs ligands déclenche l'apoptose dans les cellules cibles mais peut éventuellement activer d'autres voies (NF-kB, JNK/c-Jun, p38/MAPK/AP-1) qui induisent d'autres processus comme la survie cellulaire ou l'inflammation (Neumann et al., 2010; Varfolomeev et al., 2005). La voie du récepteur TNF-R1 induit ainsi principalement l'activation des cascades de signalisation NF-kB, JNK/c-Jun, p38/MAPK/AP-1, mais peut aussi induire la mort cellulaire dans certaines conditions (Micheau and Tschopp, 2003; Walczak, 2011).

La transduction du signal apoptotique par FAS, DR4 et DR5 se fait par des étapes communes (**figure 13**). Lors de la liaison avec leurs ligands, FAS, DR4 ou DR5 se multimérisent à la membrane cellulaire conduisant à un changement conformationnel dans le domaine intracellulaire du récepteur (Mohan et al., 2002). Ceci conduit au recrutement d'une protéine adaptatrice, à savoir la protéine FADD (Fas-associated protein with death domain Fas), qui contient à la fois un domaine de mort (DD) et un domaine effecteur de mort (DED). Ce DED va permettre le recrutement de caspases initiatrices (caspase-8 et Caspase-10) qui contiennent également un DED (Sprick et al., 2000). Le complexe résultant est appelé DISC (Death inducing signaling complex). Au sein du DISC, les caspases initiatrices vont s'auto-activer par rapprochement et du fait de leur concentration élevée à ce niveau. Une fois les caspases initiatrices actives libérées dans le cytoplasme, elles peuvent cliver des substrats en aval, soit directement par l'activation des caspases effectrices 3 ou 7, soit indirectement par des mécanismes dépendant des mitochondries, induisant ainsi l'apoptose des cellules cibles (Kischkel et al., 1995).



Figure 13: La transduction du signal apoptotique par les récepteurs à domaine de mort FAS, DR4 et DR5 se déroule par des étapes partagées. Lors de la liaison avec leurs ligands, FAS, DR4 ou DR5 se multimérisent à la surface cellulaire conduisant à un changement conformationnel dans le domaine intracellulaire du récepteur. Ceci conduit au recrutement de la protéine adaptatrice FADD, qui contient un domaine de mort (DD) qui interagit avec le un domaine effecteur de mort (DED) qui recrute la pro-caspase 8. Le complexe résultant est appelé DISC. Dans le DISC, des concentrations locales élevées des caspases initiatrices conduisent à la formation d'homodimères impliqués dans leur activation avant leur libération dans le cytoplasme où elles peuvent cliver des substrats en aval, soit par activation directe des caspases effectrices 3 (cellules de type I) soit indirectement *via* Le clivage de la protéine Bid en Bid tronqué, qui relie la caspase 8 à la voie mitochondriale (cellules de type II). La protéine cFLIP est un homologue de la caspase 8 qui agit comme un inhibiteur compétitif de l'activation de la caspase 8. D'après (Thiery et al., 2015)

# III. Echappement à l'immunosurveillance

La résistance tumorale au système immunitaire est une conséquence majeure de l'immunoediting (voir ci-dessous) chez un individu immunocompétent dans la plupart des cancers et surtout au cours du stade métastatique (Dunn et al., 2002; El Hage et al., 2008). En effet, les tumeurs qui se développent jusqu'à un stade cliniquement détectable ont nécessairement acquis des caractéristiques leur permettant de résister à l'immunosurveillance ou de créer un microenvironnement favorable à

leur développement. L'importance de ce processus a permis son intégration dans les caractéristiques de base (ou « hallmarks ») permettant la progression tumorale (**figure 14**) (Quail and Joyce, 2013).



**Figure 14**: Les dix propriétés du cancer. Hanahan et Weinberg ont décrit dix propriétés importantes qu'acquiert une tumeur pour son développement. Parmi ces caractéristiques, l'échappement à l'immunosurveillance joue un rôle important dans l'acquisition du phénotype tumoral. D'après (Hanahan and Weinberg, 2011).

## 1. La théorie de l'immunoediting: les trois E

Les observations in vitro et in vivo suggèrent que le système immunitaire peut avoir un rôle protecteur contre le développement tumoral mais que parallèlement, ce système immunitaire participe également à la sélection de variants tumoraux associés à une faible immunogénicité, permettant ainsi aux tumeurs de mettre en place des mécanismes d'échappement à la détection immunologique et à leur élimination se traduisant in fine par l'appariation d'une tumeur cliniquement détectable. Toutes ces observations ont conduit ainsi à une évolution du concept d'immunosurveillance vers le concept d'immunoediting. Cette théorie de l'immunoediting des cancers, ou théorie des trois E, a été émise par Schreiber et ses collègues qui ont décomposé la progression tumorale en trois phases distinctes : une phase d'élimination, une phase d'équilibre et une phase d'échappement (Dunn et al., 2004) (figure 15). La phase d'élimination correspond au concept d'immunosurveillance et correspond donc à la phase durant laquelle le système immunitaire combat efficacement la tumeur. Durant cette phase, la tumeur devient invasive et son microenvironnement se met en place engendrant des signaux inflammatoires qui aboutissent au recrutement des cellules du système immunitaire telles que les cellules NK, les lymphocytes T, les macrophages et les DC (Girardi et al., 2001; Matzinger, 1994; Smyth et al., 2001). Les TAA exprimés par les cellules tumorales, vont stimuler les cellules de l'immunité innée (comme les cellules NK) aboutissant à la production d'IFN, qui pourrait ainsi détruire quelques cellules tumorales (Cerwenka et al., 2000; Diefenbach et al., 2001; Yokovama, 2000). Cette production d'IFN peut aboutir à la production de différentes chimiokines par les cellules tumorales ellesmêmes. Ces chimiokines vont bloquer l'angiogénèse et détruire encore plus de cellules tumorales (Cole et al., 1998; Liao et al., 1995; Luster and Ravetch, 1987). Les débris cellulaires tumoraux vont être ingérés par les DC qui vont retourner au niveau des ganglions lymphatiques et activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs qui pourront par la suite, rejoindre le site tumoral et lyser la tumeur (Ferlazzo et al., 2002; Gerosa et al., 2002; Piccioli et al., 2002). Durant la phase d'équilibre, les cellules tumorales qui n'auront pas été éradiquées par les cellules de l'immunité vont entrer dans un état « d'équilibre » durant lequel elles se trouvent dans un état de « dormance ». Cette phase, est la plus longue et peut durer jusqu'à 20 ans avant que la tumeur ne devienne cliniquement détectable (Loeb et al., 2003). Durant cette phase, une pression de sélection est exercée par les lymphocytes T sur les cellules tumorales génétiquement instables et qui subissent des modifications épigénétiques entraînant la sélection de clones tumoraux avec une immunogénicité réduite. Après la phase d'équilibre, une tumeur peut complètement échapper à la pression exercée par le système immunitaire aboutissant à la troisième et dernière phase « l'échappement ». Ainsi, les nouveaux variants tumoraux qui ont été selectionnés durant la phase précédente, peuvent se développer dans un environnement immunologiquement intact. Ces variants tumoraux sont résistants à la lyse et peuvent ainsi échapper à la détection et à l'élimination par les cellules immunitaires. Une des conséquences importantes du concept d'immunoediting est l'immunorésistance intrinsèque de la plupart des tumeurs se développant chez un individu immunocompétent après acquisition des caractéristiques leur permettant d'échapper à l'immunosurveillance.



**Figure 15: Le concept d'immunoediting.** La théorie de l'immunoediting comporte 3 phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. La phase d'élimination (1) correspond à la défense mise en place par les cellules de l'immunité innée et adaptative à l'encontre des cellules tumorales dans le but d'éliminer ces cellules et d'empêcher le

développement d'une tumeur. Si les cellules de l'immunité ne parviennent pas à détruire toutes les cellules tumorales, le système immunitaire et les cellules cancéreuses atteignent un état d'équilibre durant lequel les cellules immunitaires gardent le dessus sur les cellules tumorales sans pour autant éradiquer la tumeur. Durant cette phase, qu'on appelle l'équilibre (2), les cellules immunitaires exercent une pression sélective qui aboutira à l'émergence de variants résistants. Ceci aboutissant à la dernière phase qu'est l'échappement (3), où les cellules tumorales vont pouvoir elles-mêmes inhiber le système immunitaire et croitre indéfiniment. D'après (Strausberg, 2005).

# 2. Les mécanismes d'échappement immunitaire

Comme mentionné précédemment, les cellules tumorales peuvent échapper à la réponse immune anti-tumorale. De nombreux travaux ont ainsi mis en évidence différents mécanismes moléculaires permettant à la tumeur d'échapper ou d'interférer avec la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces mécanismes d'échappement peuvent être classés en plusieurs catégories, selon qu'ils soient inhérents aux cellules cancéreuses, au microenvironnement tumoral ou aux effecteurs du système immunitaire. Dans les chapitres suivants, je vais détailler certains de ces mécanismes permettant aux cellules tumorales d'échapper *in fine* aux lymphocytes T mais aussi aux cellules NK, cette dernière population étant particulièrement relevante en ce qui concerne mes travaux de thèse.

# 2.1. Echappement à la reconnaissance et anergie

La reconnaissance antigénique est une étape clé pour la mise en place d'une réponse T cytotoxique efficace. De nombreuses cellules tumorales échappent au système immunitaire suite à une perte d'expression de l'antigène ou à une altération de la présentation des TAA à leur membrane. En effet, il a été décrit que la présentation antigénique par les cellules tumorales est altérée partiellement ou totalement suite à des mutations d'un ou plusieurs gènes codant la machinerie d'apprêtement du peptide (Drake et al., 2006; Marincola et al., 2000). Ainsi, deux sous-unités de l'immunoprotéasome, LMP2 et LMP7 (Low molecular mass polypeptide-2 et 7), peuvent voir leur expression diminuée conduisant à une altération de la présentation antigénique par les molécules du CMH (Restifo et al., 1993). Deux autres protéines ont été rapportées avoir un rôle dans l'altération de la présentation antigénique, il s'agit des protéines TAP (Transporter associated with antigen processing) et de la tapasine. Ces protéines sont impliquées dans le chargement des peptides antigéniques sur les molécules du CMH-I et leur mutation entraîne une baisse d'expression des protéines TAP dans les cellules tumorales et par conséquent une perte d'expression des molécules du CMH-I (Cromme et al., 1994; Garrido et al., 1997; Hicklin et al., 1999). De plus, au cours de la progression tumorale, une perte complète des molécules de CMH-I est principalement due à des mutations de la sous-unité β2-microglobuline (Bicknell et al., 1994). Ainsi, de manière générale, les défauts de présentation de l'antigène se développent plus dans les lésions métastatiques que dans les tumeurs primaires (Kim et al., 1975).

# 2.2. Perte d'expression des molécules d'adhésion

Le couple LFA-1/ICAM1 exprimés respectivement par les lymphocytes T et les cellules tumorales, joue un rôle essentiel dans la formation de la synapse immunologique et dans la polarisation des granules cytotoxiques (Anikeeva et al., 2005). De ce fait, la diminution d'expression de ICAM-1 à la surface des cellules tumorales représente un mécanisme important d'échappement à l'immunosurveillance (Passlick et al., 1996). Les cellules tumorales peuvent diminuer ou perdre l'expression d'autres molécules d'adhésion telles que les molécules LFA-3. Il a aussi été décrit que les cellules tumorales peuvent exprimer des molécules anti-adhérentes telles que les mucines, échappant ainsi aux contacts avec les cellules immunocompétentes (Kontani et al., 2001).

# 2.3. Baisse d'expression des ligands activateurs des NK

L'expression augmentée des ligands activateurs des récepteurs des cellules NK comme MICA/B est observée dans différentes cellules après transformation tumorale ou dans des conditions de stress, ce qui représente un moyen intrinsèque de protection de l'organisme en rendant ces cellules plus sensibles à la lyse induite par cellules NK (Diefenbach and Raulet, 1999). Cependant, la diminution d'expression de ces ligands permet également aux cellules tumorales d'échapper aux cellules effectrices de la réponse immunitaire. Les leucémies sont l'un des meilleurs exemples de cette observation où la diminution ou même l'absence totale d'expression des ligands activateurs des récepteurs des cellules NK comme les NCR ou NKG2D ont été fréquemment observées (Lion et al., 2012). On peut encore citer la capacité de l'IL-10 à réprimer l'expression du ligand MICA, à la surface des cellules tumorales de mélanome (Serrano et al., 2011). Ces ligands peuvent également subir un clivage protéolytique notamment par des métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Groth et al., 2011; Salih et al., 2002). L'absence de signaux costimulateurs conduit également à l'évasion des cellules tumorales à la lyse par les cellules effectrices (Driessens et al., 2009; Igney and Krammer, 2002). Cette déficience de signaux costimulateurs conduit à l'anergie des lymphocytes T, à l'absence d'activité cytotoxique et à l'incapacité des cellules naïves à proliférer et produire des cytokines induisant l'activité lytique des cellules effectrices.

# 2.4. Augmentation d'expression des ligands inhibiteurs des NK

En plus de la baisse d'expression des ligands des récepteurs activateurs, les cellules tumorales peuvent aussi augmenter l'expression de ligands des récepteurs inhibiteurs des cellules NK (Chretien et al., 2014). Les cellules tumorales peuvent en effet augmenter l'expression de molécules de CMH-I non classiques connues sous le nom de MHC classe I b: HLA-G et HLA-E (da Silva et al., 2013; de Kruijf et al., 2010; Zeestraten et al., 2014). Ces molécules peuvent perturber l'équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs et participer à l'échappement immunitaire. L'expression

de ces ligands inhibe l'activité cytotoxique des cellules NK par l'interaction avec des récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules NK comme le récepteur LILRB1 (leukocyte ig-like receptor B1). LILRB1 avec d'autres récepteurs comme l'ILT-4 (immunoglobulin-like transcript 4) ou KIR2DL4/p49 jouent un rôle critique dans le maintien de la tolérance immunitaire en inhibant la fonction cytotoxique des cellules effectrices (Baudhuin et al., 2012; Heidenreich et al., 2012; Manaster et al., 2012). HLA-E interagit avec le récepteur inhibiteur CD94 /NKG2A présent à la surface des cellules NK et des cellules T CD8<sup>+</sup> et aboutit à la suppression de leur activité cytotoxique (Sala et al., 2004). De la même manière, il a été montré que l'expression membranaire ou soluble de HLA-G peut réduire la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse médiée par des cellules effectrices (Paul et al., 1998).

# 2.5. Résistance à la voie perforine/granzymes et aux récepteurs à domaine de mort

La résistance des cellules tumorales à la voie perforine/granzymes a été démontrée dans des modèles de tumeurs différents. L'apparition de résistance est le résultat d'une ou plusieurs modifications au niveau des voies de signalisation pro-apoptotiques qui conduisent normalement à la mort des cellules cibles par apoptose. De manière plus générale, la modification de l'expression des gènes impliqués dans la voie de mort mitochondriale (surexpression de Bcl-2, Bcl-XL, des IAPs), les mutations des protéines Bax, Bak ou d'Apaf-1, pourraient modifier la lyse tumorale dépendante de la voie perforine/granzyme conduisant à un échappement immunitaire tumoral (Bladergroen et al., 2002; van Houdt et al., 2005). De plus, l'expression de la serpine PI9/SPI6 (un inhibiteur du granzyme B) par les cellules tumorales pourrait conduire à l'échappement des cellules tumorales à la mort induite par les NK et les CTLs *in vitro* ainsi que *in vivo* (Medema et al., 2001). Ainsi, l'expression de l'ARNm de PI9 ou de son homologue murin SPI6 a été trouvée dans des lignées cellulaires tumorales humaines (mélanome, carcinome du col, du sein et du côlon) et murines (carcinome du côlon et du poumon). De plus, 39% des lymphomes à cellules T, 27% des lymphomes à cellules B et 10% du lymphome de Hodgkin expriment les serpines.

La résistance à l'apoptose induite par la voie Fas/CD95 et DR5/DR4 a été également démontrée dans de nombreuses tumeurs (Ivanov et al., 2003). Cette résistance peut être expliquée par le manque d'expression de Fas ou du fait d'un défaut d'interaction entre Fas et FasL (Landowski et al., 1997; Maecker et al., 2002; Wohlfart et al., 2004). Outre le défaut d'interactions récepteur/ligand, les perturbations dans les voies de signalisation apoptotiques pourraient également générer une résistance. Les mécanismes affectant les différentes protéines impliquées dans la formation de DISC, les mutations qui inactivent FADD ou l'inactivation de la procaspase-8 par hyperméthylation ou délétion pourraient résulter en une résistance à l'apoptose induite par la voie des récepteurs à domaine de mort (Fulda et al., 2001; Hopkins-Donaldson et al., 2003; Zhang and Fang, 2005). De

plus, un mécanisme peut empêcher « l'auto-processing » de la pro-caspase-8 au niveau du DISC, du fait de la surexpression au niveau de cellules tumorales de protéine cFLIP qui agit comme un inhibiteur compétitif de l'activation de la caspase 8 (Medema et al., 2001).

## 2.6. Expression de facteurs immunosuppresseurs

Plusieurs molécules potentiellement sécrétées par les cellules tumorales ont des effets inhibiteurs sur les fonctions des cellules immunitaires notamment le TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ), l'IL-10, le VEGF (Vascular endothelial growth factor) ou encore l'enzyme indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO).

Le TGF- $\beta$  est une cytokine pléiotropique qui possède des propriétés immunomodulatrices puissantes. Il est produit par plusieurs cellules de l'immunité telles que les macrophages, les DC et les lymphocytes et permet de contrôler la différenciation, la prolifération et l'activation des cellules immunitaires (Letterio and Roberts, 1998). Le TGF- $\beta$  peut moduler l'expression des molécules d'adhésion, fournir un gradient chimiotactique pour les lymphocytes et d'autres cellules participant ainsi à une réponse inflammatoire. Il existe 3 isoformes du TGF- $\beta$ , le TGF- $\beta$  1, 2 et 3, qui agissent par les mêmes récepteurs de type sérine-thréonine kinase de type I et de type II exprimés par les cellules. Le TGF- $\beta$  est connu pour ses capacités à inhiber la prolifération des lymphocytes T et stimuler l'apoptose, agissant ainsi comme une molécule immunosuppressive. Il a été montré que cette cytokine agit comme un facteur suppresseur de l'inflammation en favorisant la mort des cellules T activées (Sillett et al., 2001). En outre, les cellules T apoptotiques libèrent du TGF- $\beta$ , contribuant ainsi au maintien d'un environnement immunosuppression du récepteur activateur NKG2D dans les cellules T CD8<sup>+</sup> et NK ainsi que l'expression de son ligand MICA (Friese et al., 2004).

L'IL-10, sécrétée par de nombreuses cellules tumorales, inhibe la réponse anti-tumorale en agissant sur la sécrétion d'IL-12 par les DC, entraînant une inhibition de leur fonctionnalité. L'IL-10 augmente l'apoptose spontanée des DC et leur susceptibilité à la lyse induite par les cellules NK autologues. Les propriétés immunosuppressives de l'IL-10 sont également liées aux effets de cette cytokine sur les fonction des monocytes et des macrophages ainsi que sur les lymphocytes T en interférant avec les signaux d'activation délivrés aux lymphocytes T par les CPA (Mittal et al., 2015).

Le VEGF est capable de bloquer la différenciation et la maturation des DC en inhibant le facteur de transcription NF-κB (Nuclear factor-kappa B) (Ohm et al., 2003).

La molécule IDO est exprimée par de multiples types cellulaires en réponse à une inflammation. En effet, son expression peut être induite par l'IFN $\gamma$  ou l'IFN $\alpha$ . Le mécanisme d'action immunosuppresseur de cette enzyme de la voie kynurénine repose sur une réduction locale de la concentration en tryptophane, due à sa conversion en kynurénine et à la production de métabolites de tryptophane pro-apoptotiques (Grohmann et al., 2003). Certains de ces métabolites inhibent la prolifération des lymphocytes T *in vitro* ou induisent leur mort par apoptose (Frumento et al., 2002) alors que d'autres affectent la fonction des cellules NK (Chiesa et al., 2006).

# 2.7. Recrutement dans le microenvironnement de cellules immunosuppressives

Le recrutement dans le microenvironnement tumoral de cellules suppressives (lymphocytes T régulateurs, lymphocytes B régulateurs, cellules myéloïdes suppressives, macrophages associés aux tumeurs, cellules NKT,...) en réponse à divers stimuli (**figure 16**), joue un rôle primordial dans l'échappement des cellules cancéreuses à l'immunité anti-tumorale.

# 2.7.1. Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les lymphocytes Treg sont essentiels pour maintenir la tolérance périphérique, prévenir les maladies auto-immunes et limiter les maladies inflammatoires chroniques. Cependant, ils limitent également les réponses bénéfiques de l'immunité anti-tumorale. En effet, une des stratégies essentielle à l'échappement à l'immunosurveillance est celle exercée par les cellules Treg (Li and Rudensky, 2016; Vignali et al., 2008). Cette population est directement amplifiée par le VEGF dans le microenvironnement tumoral (Terme et al., 2013). Ces lymphocytes se caractérisent essentiellement par la sécrétion de médiateurs immunosuppressifs comme le TGF-β et l'IL-10. Ces cellules inhibent la prolifération et l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> spécifiques et la production d'IL-2. Il a également été décrit que les Treg peuvent induire l'apoptose des cellules T CD4<sup>+</sup> en déprivant le milieu en IL-2 et IL-7 (Pandiyan et al., 2007). De plus, il a été montré *in vitro* que les cellules Treg sont capables de lyser les lymphocytes T effecteurs et les DC via la sécrétion de granzyme et de perforine (Gondek et al., 2005). Ivars et ses collègues ont aussi montré que les cellules Treg pouvaient réduire l'expression des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 par les DC in vitro (Cederborn et al., 2000). Par ailleurs, les cellules Treg naturelles CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> sont capables d'inhiber la maturation et l'activation des DC via la molécule CTLA-4 (Read et al., 2000). De plus, Les cellules Treg sont capables d'augmenter l'expression de l'enzyme IDO par les DC (Fallarino et al., 2003). Plusieurs études ont montré dans ce sens les effets immunomodulateurs des cellules Treg sur la maturation et/ou la fonction des DC (Houot et al., 2006; Misra et al., 2004; Serra et al., 2003).

## 2.7.2. Les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSCs)

Une des étapes majeures du processus d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire est l'accumulation de MDSCs (Myeloid-Derived Suppressor Cells) au sein de la tumeur. Ces MDSCs représentent une population hétérogène de cellules immatures, comprenant des progéniteurs myéloïdes, des neutrophiles, des monocytes et des DC (Murdoch et al., 2008). Les MDSCs ont un rôle majeur dans les dysfonctionnements du système immunitaire chez la plupart des patients atteints de tumeurs (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). La prolifération et l'activation aberrante des MDSCs sont induites par l'inflammation chronique dans le stroma tumoral (Meyer et al., 2011). Elles sont en outre caractérisées par la production continue de médiateurs inflammatoires comme l'IL-1 ou l'IL-6 (Gabrilovich et al., 2012), par l'expression de facteurs immunosuppresseurs, tels que l'arginase 1 (ARG1) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS; également connu sous le nom NOS2), ainsi que par la forte production de NO (oxyde nitrique) et de ROS. Chez des souris porteuses de tumeurs, les MDSCs s'accumulent dans le sang périphérique, la moelle osseuse, la rate, ainsi que dans les tumeurs solides primaires et métastatiques, et dans une moindre mesure dans les ganglions lymphatiques (Marigo et al., 2008; Sinha et al., 2008). Chez les patients cancéreux, elles sont présentes dans le sang (Almand et al., 2001; Diaz-Montero et al., 2009). Ces cellules sont susceptibles d'être un facteur majeur bloquant l'efficacité des immunothérapies (Marx, 2008).

## 2.7.3. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

Les macrophages associés aux tumeurs sont dérivés des monocytes sanguins. Ces macrophages sont recrutés et dirigés par des chimiokines, des facteurs de croissance et des facteurs angiogéniques, secrétés par les cellules tumorales, tels que le CSF-1/M-CSF (colony-stimulating factor-1), le VEGF, et l'angiopoiétine-2 et CCL2 (Lewis and Pollard, 2006; Sica and Bronte, 2007). Ces facteurs sont importants dans le recrutement et l'impulsion directionnelle des monocytes du sang circulant vers le microenvironnement tumoral. Au sein du stroma tumoral, les monocytes recrutés se différencient en TAMs, qui rentrent alors en symbiose avec les cellules tumorales (Quatromoni and Eruslanov, 2012). Selon les cytokines présentes dans la tumeur, les monocytes deviennent soit des macrophages de type M1, soit des macrophages type M2 dont l'action est opposée. En effet, les macrophages M1, activés en réponse à l'IFN-γ, produisent un taux élevé d'IL-12, d'IL-23 et de NO. Ce phénomène leur permet de développer une capacité importante à présenter l'antigène. Ces macrophages M2 sont activés sous l'effet des signaux tels que la présence d'IL-4, d'IL-13, d'IL-10 et de M-CSF, et favorisent la progression des tumeurs. Ces macrophages produisent un niveau élevé d'IL-10 et un faible niveau d'IL-12, ce qui conduit à une faible capacité à présenter l'antigène. Les

macrophages M2 favoriseraient aussi la progression tumorale en s'impliquant dans l'angiogenèse (Coussens and Werb, 2002) et dans le remodelage de la matrice extracellulaire, puisqu'ils produisent également des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9). Ces macrophages de type M2 ont également un rôle dans la différentiation des cellules Treg en se liant à la membrane de ces cellules par l'intermédiaire d'un médiateur immunosuppresseur, le TGF- $\beta$ 1, exprimé sur leurs surfaces. Cela entraine la suppression des fonctions des cellules T anti-tumorales et des autres cellules inflammatoires, telles que les monocytes (Savage et al., 2008). Une étude a également mis en évidence des marqueurs moléculaires caractéristiques des macrophages, associés à un mauvais pronostic du cancer du sein, comme CD68 (Paik et al., 2004). Une haute densité de TAM dans la tumeur est ainsi maintenant reconnue comme un marqueur de mauvais pronostic dans divers types de cancers. De plus, des études réalisées sur des modèles animaux ont confirmé l'intérêt thérapeutique important de cibler les macrophages de type M2 (Choi et al., 2007; Valable et al., 2008).



Figure 16: Les cellules immunitaires et non immunitaires dans le stroma tumoral présentant des fonctions immunosuppressives. Dans le stroma de la tumeur, plusieurs cellules immunitaires et non immunitaires différentes répondent aux stimuli tumoraux et présentent des fonctions régulatrices ou immunosuppressives complexes, soit de manière dépendante du contact cellule-cellule, soit par la sécrétion de médiateurs solubles. Parmi ces cellules se trouvent : les cellules B régulatrices (Breg); les cellules dendritiques (DC); les cellules myéloïdes immunosuppressives granulocytiques et myéloïdes (G-MDSC et M-MDSC); les cellules NKT; les TAM, les neutrophile associés aux tumeurs (TAN); les cellules Treg et les cellules stromales tumorales (TSC). D'après (Lindau et al., 2013).

La réponse immune antitumorale est donc potentiellement altérée par divers mécanismes mis en place par les cellules tumorales. En outre, au cours des dernières années, il est devenu clair que le stroma tumoral détourne également progressivement cette réponse vers l'induction d'une tolérance. Je vais donc au cours des chapitres suivants décrire le concept de microenvironnement tumoral et d'hypoxie tumorale.

# IV. Le microenvironnement tumoral

### IV. Généralités : importance du microenvironnement dans la progression tumorale

Une tumeur se développe au sein d'un microenvironnement appelé aussi stroma tumoral, composé de nombreux types cellulaires non tumoraux évoluant au sein d'une matrice extracellulaire. Tous ces composants interagissent avec la tumeur et participent à la génération du tissu tumoral. Stephen Paget en 1889 a posé les fondations de la recherche sur le microenvironnement tumoral (MET) en formulant la théorie du « seed and soil » (« de la graine et du sol »), née de l'observation selon laquelle chaque type de cancer possède son (ou ses) site(s) métastatique(s) privilégié(s). Il doit donc y avoir une adéquation entre la cellule cancéreuse (seed) et l'environnement tissulaire (soil) pour engendrer une métastase (Paget, 1989). Ce concept est resté dormant pendant de nombreuses années, à une époque où la génétique des tumeurs intéressait la majorité des chercheurs en oncologie. En effet, les altérations d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs, étaient à l'époque considérées comme nécessaires et suffisantes pour initier la tumorigenèse et induire la progression de la tumeur. Mais au début des années 1970, la contribution du microenvironnement à la progression tumorale a commencé à être reconnue par un nombre croissant de chercheurs. A l'origine de ce mouvement, deux équipes ont « revisité » les idées de S. Paget. La première, dirigée par Isaac P.Witz, a remarqué que les tumeurs humaines sont généralement infiltrées par des cellules inflammatoires (lymphocytes T et B, cellules NK, macrophages), indiquant que l'hôte n'est pas indifférent à la tumeur et qu'il tente d'interférer avec son développement (Witz, 2008). La deuxième, dirigée par Judah Folkman, a concerné l'angiogenèse tumorale. Cette équipe a réalisé rapidement que la prolifération tumorale est dépendante de l'apport sanguin et que les interactions entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales initient et encadrent ce processus (Folkman, 2006). L'équipe de Mina Bissell est ensuite rapidement intervenue dans ce courant de pensée, et a fait le parallèle entre l'importance cruciale du microenvironnement au cours du développement mammaire et son rôle dans la progression tumorale mammaire (Park et al., 2000a). Ces dernières années, un nombre important d'articles et de revues a été consacré à l'étude du MET et du stroma. Ces études sont multidisciplinaires avec des approches utilisant des modèles in vitro et in vivo de prolifération tumorale, d'invasion, de remodelage cellulaire, d'angiogenèse et d'inflammation. Certaines études de nature préclinique et même clinique ont apporté des éléments déterminants dans ce champ d'investigation. Il n'est plus à démontrer que la progression tumorale est un processus multigénique et multi-étape qui dépend très largement d'influences diverses exercées par le MET (Benard, 2004). En effet, une tumeur dépourvue de stroma ne peut se développer au-delà d'un faible volume et se nécrose. La composante stromale indispensable à ce niveau est la néovascularisation tumorale (Carmeliet, 2003; Hanahan and Folkman, 1996). Au-delà de la prolifération de la masse tumorale, la vascularisation sanguine et/ou lymphatique demeure indispensable pour le processus métastatique et constitue un environnement favorable à l'échappement cellulaire. L'étude du microenvironnement tumoral joue donc un rôle primordial pour la compréhension du développement des tumeurs et, par conséquent, pour les approches thérapeutiques à mettre en œuvre.

# V. Composition du microenvironnement tumoral

Les interactions entre les cellules tumorales et les différents composants de leur microenvironnement jouent un rôle stimulant dans la progression tumorale, en régulant l'expression de nombreux gènes dans les cellules tumorales et les cellules stromales. Plusieurs termes tels que environnement, microenvironnement ou stroma seront utilisés de la même manière dans ce manuscrit pour décrire l'écosystème entourant les cellules tumorales. Ce microenvironnement est composé d'éléments acellulaires de la matrice extracellulaire et d'une partie cellulaire, représentée par des fibroblastes, des cellules inflammatoires, des cellules stromales et des cellules endothéliales (figure 17). Tous ces composants interagissent entre eux *via* des facteurs de croissance, des cytokines et des interactions directes notamment grâce à des molécules d'adhésion. Ces interactions dynamiques entre les cellules épithéliales et stromales jouent un rôle essentiel dans les différents processus du développement du cancer, tels que l'adhésion, la prolifération, la différentiation et la migration cellulaire.



Vascular network

Figure 17: Les origines et l'influence de l'hétérogénéité de la tumeur. La formation des tumeurs implique la coévolution des cellules néoplasiques avec la matrice extracellulaire et les vaisseaux sanguins, ainsi que les cellules stromales et immunitaires. La niche de la tumeur est une topographie physique/dynamique dans laquelle un support structurel, l'accès à des facteurs de croissance, l'apport vasculaire et les interactions des cellules immunitaires peuvent varier considérablement, même au sein de la même lésion. L'infiltrat immunitaire peut comprendre plusieurs types de cellules, ces populations de cellules peuvent avoir des fonctions pro-et-anti-tumorales et peuvent varier dans leur état d'activation et leur localisation au sein la tumeur. Le réseau vasculaire peut différer en ce qui concerne les tissus, la maturité, la pression interstitielle et la fonctionnalité. les fibroblastes associés au cancer peuvent avoir une plasticité importante et divergent en ce qui concerne le statut d'activation, la localisation dans le tissu et l'origine. D'après (Junttila and de Sauvage, 2013).

## 5.1. La composante matricielle

#### 5.1.1. Composition de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est définie comme un mélange complexe de protéines (collagènes, tenascine, laminine, fibronectine, cadhérines, intégrines) et de protéoglycanes (sulfate de chondroïtine, sulfate d'héparane, acide hyaluronique) fournissant un support mécanique et structurel aux cellules et aux tissus. La matrice extracellulaire (MEC) peut également réguler des processus cellulaires comme la mort cellulaire, l'adhésion, la migration, l'invasion, l'expression génique et la différenciation (Marastoni et al., 2008; Pupa et al., 2002; Schultz and Wysocki, 2009). Parmi les nombreux composants de la MEC, les collagènes sont les constituants majeurs, le collagène de type II étant la protéine structurale majoritaire de la MEC interstitielle. Le collagène de type III est fréquemment lié au collagène I, alors que le collagène de type IV est un composant essentiel de la membrane basale (Egeblad et al., 2010). La tenascine-c (TNC) est une protéine multifonctionnelle

exprimée faiblement dans les tissus normaux adultes mais surexprimée dans certaines situations comme l'embryogenèse, la cicatrisation et la réaction desmoplastique au cours de la progression tumorale (Jones and Jones, 2000). La fibronectine, qui est une glycoprotéine présente dans la matrice extracellulaire, joue quant à elle un rôle clé dans l'adhésion des cellules à la MEC (Kaspar et al., 2006). Ces protéines ont un rôle majeur dans la progression tumorale. De plus, la matrice extracellulaire tumorale n'est pas une structure figée mais en constant remaniement, ce qui a également un profond impact sur la progression tumorale.

## 5.1.2. Remodelage de la matrice extracellulaire par les métalloprotéinases

La protéolyse extracellulaire favorise l'homéostasie tissulaire. Dans le cancer, la protéolyse altérée conduit à une croissance tumorale non régulée, un remodelage tissulaire, une inflammation, une invasion tissulaire et favorise le processus métastatique (McCawley and Matrisian, 2000). Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) représentent la famille la plus proéminente de protéinases associées à la tumorigénèse. Les progrès technologiques récents ont nettement amélioré la compréhension des mécanismes d'action des MMPs en tant que modulateurs du MET. En plus de leur rôle dans le renouvellement matriciel et la migration des cellules cancéreuses, les MMPs régulent divers processus biologiques normaux et des voies de signalisation qui contrôlent la croissance cellulaire, l'inflammation ou l'angiogenèse et peuvent même fonctionner de manière non protéolytique. Ces aspects de la fonction des MMP réorientent également les approches de la thérapie du cancer en les ciblant (Kessenbrock et al., 2010).

# 5.1.2.1. Définition des métalloprotéinases

Les enzymes protéolytiques, connues sous le nom de protéases, représentent 2% du génome humain. Ces protéases sont réparties en 4 grandes familles: les protéases aspartiques, les cystéine protéases, les sérine protéases et les métalloprotéases (Abbenante and Fairlie, 2005). Deux grands groupes de matalloprotéases peuvent être distingués: celui des protéases impliquées dans l'anabolisme et/ou le catabolisme d'effecteurs peptidiques, et celui des protéases matricielles dont le rôle est de modifier le tissu extracellulaire. Ces métalloprotéases constituent donc des cibles de choix dans les différentes stratégies thérapeutiques puisqu'elles sont impliquées dans beaucoup de mécanismes physiologiques comme la régulation de la pression artérielle avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine et l'enzyme de conversion à l'endothéline (Gavras et al., 1974), mais aussi dans la régulation de la coagulation avec la carboxypeptidase U (Barrow et al., 2003). Parmi les métalloprotéases (superfamille des « metzincines »), on retrouve notamment les adamlysines et les matrixines ou MMPs (figure 18). Les MMPs constituent une famille de plus d'une vingtaine

d'endopeptidases calcium- et zinc-dépendantes. Les MMPs sont des protéines à multidomaines avec des domaines catalytiques globulaires d'approximativement 130-260 résidus et ayant une architecture de noyau commune qui se caractérise par un long motif consensus de fixation du zinc, HEXXHXXGXX (H/D), et une structure de « Met-turn » qui le stabilise (Sterchi, 2008). La plupart des MMPs sont sécrétées immédiatement après leur synthèse, de manière constitutive, sauf lorsqu'elles sont synthétisées dans les polynucléaires neutrophiles où elles restent stockées sous forme latente dans différents granules cytoplasmiques et ne sont libérées qu'au niveau de sites inflammatoires (Loffek et al., 2011).

Étroitement liés aux MMP, les ADAM (une désintégrine et métalloprotéinase) et les ADAMTS (une désintégrine et une métalloprotéinase avec des motifs de thrombospondine) appartiennent également à la famille des « metzincines ». Les ADAM remplissent un large éventail de fonctions notamment dans le développement de cancers (Edwards et al., 2008).



Figure 18 : Vue schématique de la structure des membres de la famille des MMPs et de la relation avec d'autres membres de la superfamille des metzincines. Les MMPs partagent un domaine de structure commun: le pré-domaine qui contient un peptide signal responsable de la sécrétion; le pro-domaine qui maintient l'enzyme inactive par une interaction entre un résidu cystéine et le groupe ion  $Zn^{2+}$  du domaine catalytique; et le domaine haemopexin-like carboxy-terminal, qui est lié au domaine catalytique par une région de charnière flexible. MMP7 et MMP26 sont

dépourvues de la région charnière et du domaine de l'hémopéxine. MMP2 et MMP9 contiennent un motif de fibronectine de type II inséré dans le site catalytique, et les MMPs de type membranaire (MT-MMP) ont un domaine transmembranaire de glycosyl-phospatidylinositol (GPI) dans leur partie C terminale. MMP23 possède des caractéristiques uniques: une ancre qui cible MMP23 à la membrane cellulaire, un réseau de cystéines et un domaine de type immunoglobuline-like (Vandenbroucke and Libert, 2014).

# 5.1.2.2. Classification des métalloprotéinases matricielles

Il est fait référence aux MMPs soit par leur nom commun soit par une nomenclature numérique séquentielle réservée aux vertébrés. Très peu de véritables substrats des MMPs ont été définitivement identifiés *in vivo*, la plupart des candidats ont été testés et identifiés *in vitro*. Pendant très longtemps, seuls les substrats conventionnels des MMP, c'est à dire les substrats matriciels, ont été explorés, mais cela ne donne qu'une vision limitée et tronquée du champ de substrats de ces enzymes. En effet, les MMPs ont la capacité de cliver bon nombre de substrats non conventionnels, tels que des cytokines, des facteurs de croissance, des récepteurs ainsi que d'autres protéines. Par contre, les substrats conventionnels ont permis de répartir les membres de la famille MMP en quatre groupes principaux que sont les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, et les MMPs membranaires (Hiller et al., 2000; Park et al., 2000b; Uria and Lopez-Otin, 2000) (**table 4**).

Enzymes	N°	Sélection de substrats préférentiels
Collagénases		
collagénase-1 (interstitielle)	MMP-1	collagènes III>I>II
collagénase-2 (de neutrophile)	MMP-8	collagènes I>III, II
collagénase-3 (de type rongeur)	MMP-13	colla gènes II>I=III, proMMP-9
Gélatinases	_	
gélatinase A	MMP-2	gélatines, collagènes I, IV, V, VII, X, XI, élastine, fibronectine, laminine, aggrécanne
gélatinase B	MMP-9	gélatines, collagènes IV, V, élastine
Stromélysines	_	
stromélysine-1	MMP-3	aggrécanne, fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV, proMMP-8, proMMP-9
stromélysine-2	MMP-10	aggrécanne, fibronectine, collagène IV,
matrilysine-1	MMP-7	proMMP-8 aggrécanne, fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV, élastine, proMMP-9
matrilysine-2	MMP-26	collagène IV, gélatines, fibronectine, IGFBP-1, proMMP-9
MMPs membranaires	_	
MT1-MMP	MMP-14	proMMP-2, proMMP-13, proTNF-? collagènes I, II, III, fibronectine, laminine
MT2-MMP	MMP-15	proMMP-2, proTNF-?
MT3-MMP	MMP-16	proMMP-2, proTNF-?
MT4-MMP	MMP-17	proMMP-2, proTNF-?
MT5-MMP	MMP-24	proMMP-2
MT6-MMP	MMP-25	proMMP-2, proMMP-9, ? 1-proteinase inhibitor
Autres	_	
stromélysine-3	MMP-11	IGFBP-1
métalloélastase	MMP-12	élastine, fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV
stromélysine-4, RASI	MMP-19	collagène IV, gélatines, fibronectine, laminine
énamélysine	MMP-20	amélogénine
CA-MMP	MMP-23	gélatine
homologue de la CMMP	MMP-27	inconnu
épilysine	MMP-28	inconnu

Table 4: Classification des métalloprotéinases matricielles humaines. D'après (Zitka et al., 2010).

# 5.1.2.3. Rôle des métalloprotéinases matricielles

## a) MMPs et cancer

Les MMPs ont été impliquées dans le cancer depuis plus de 40 ans. Elles induisent la dégradation de la MEC et conduisent à l'invasion et aux métastases des cellules cancéreuses (Liotta et al., 1980). La découverte que l'inhibition des MMPs supprime le potentiel invasif des tumeurs dans des études *in vivo* a conduit rapidement à la mise place d'essais cliniques utilisant des inhibiteurs de MMPs. Pourtant, ceux-ci n'ont pas réussi à augmenter le taux de survie des patients (Coussens et al., 2002). De plus, des membres des familles de protéinases ADAM et ADAMTS, qui sont également ciblés par des inhibiteurs à large spectre d'activité anti-metzincines, sont également associés à une progression tumorale (Murphy, 2008). En effet, bien que les modèles actuels suggèrent que la protéolyse extracellulaire est principalement impliquée dans la promotion du cancer, les MMPs et d'autres protéinases présentent des effets suppresseurs de tumeurs dans plusieurs circonstances.

La grande diversité aussi bien de substrats que de fonctions des MMP fait d'elles des régulatrices centrales de l'écosystème que constituent la tumeur et son stroma. Dans la plupart des cancers, les MMPs sont produites par les cellules stromales notamment les cellules immunitaires, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules progénitrices hématopoïétiques (Kessenbrock et al., 2010) (figure 19).



Figure 19: Origine de l'expression des MMPs dans le stroma tumoral. Les cellules du microenvironnement telles que les cellules inflammatoires (les neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes et les mastocytes), les cellules endotheliales, les fibroblastes et les cellules progénitrices hématopoïétiques expriment une pléthore de métalloprotéinases qui sont libérées dans l'espace extracellulaire et influencent de multiples événements de la progression tumorale. Les TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) sont également produits et secrétés par les mêmes types cellulaires. D'après (Kessenbrock et al., 2010).
La principale fonction des MMPs semble être le remodelage tissulaire; cependant, leur action ne se restreint pas à une simple protéolyse de la matrice extracellulaire. En effet, certaines MMPs ont des rôles plus sophistiqués. Elles favorisent ainsi la libération de facteurs spécifiques de la surface cellulaire (facteurs de croissance) et participent à la modulation d'activités biologiques diverses comme l'inflammation, l'angiogenèse ou l'apoptose. Ces dernières années, un nombre toujours croissant de publications a mis l'accent sur l'importance de la famille des MMPs dans l'invasion tumorale (Sternlicht and Werb, 2001). En effet, les MMPs ont un rôle central dans la dégradation de la MEC et exercent un rôle initiateur au niveau de la néo-angiogenèse tumorale, favorisant ainsi l'invasion et les métastases (Wolf et al., 2007).

Il a été ainsi montré que des souris dont les gènes *MMP9* ou *MMP2* ont été inactivés présentent une susceptibilité diminuée, par rapport à leurs homologues sauvages, à la formation de métastases pulmonaires après injection de cellules de carcinomes. De plus, des interactions existent entre les cellules tumorales et les cellules stromales. En effet, MMP2 et MMP9 sont également secrétées par les cellules fibroblastiques avoisinantes, voire à distance des cellules cancéreuses. Ces gélatinases produites par les cellules stromales pourraient ainsi dégrader la matrice extracellulaire, permettant aux cellules tumorales d'être plus invasives. Des études antérieures ont également démontré que l'expression de MMP9 favorise l'invasion des cellules d'ostéosarcome, et la régulation négative de l'expression et de l'activité de MMP9 réduit au contraire l'invasivité (Xin et al., 2009). De plus la surexpression de plusieurs MMPs, y compris les MMP-3, -7 et -14, entraîne la formation de carcinomes (Egeblad and Werb, 2002). Il a aussi été rapporté, dans divers modèles tumoraux, que MMP2 et MMP9 sont requises pour l'induction du *switch* angiogénique (Bergers et al., 2000).

# b) MMPs et réponse immunitaire

Des études ont montré que les MMPs provenant des cellules tumorales influencent le système immunitaire de l'hôte et réduisent son activité anti-tumorale. En effet, il a été montré que la cytotoxicité des cellules NK est réduite après traitement par MMP2 et MMP9. Une augmentation significative de l'expression des KIR et des diminutions de l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK ont été observées, ce qui suggère que les MMP2 et MMP9 ont un rôle dans un mécanisme d'échappement immunitaire (Lee et al., 2008). De plus, la fonction des cellules NK est significativement diminuée après exposition à des cellules cancéreuses pancréatiques qui sécrètent des MMPs, notamment du fait de leur diminution d'expression des récepteurs activateurs de surface (NKG2D, DNAM-1, NKp30 et NKp46) et des composants des granules cytotoxiques (perforine et granzyme B); et du fait d'une diminution de leur sécrétion de cytokines (TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ). D'autres études ont révélé que la sécrétion de MMP-9 peut être impliquéé dans le dysfonctionnement des cellules NK induit par les cellules SW1990 en facilitant l'échappement à la réponse immune anti-

tumorale. Le blocage par l'inhibiteur endogène de MMPs, TIMP-1 et/ou 1-MT a ainsi permis de partiellement restaurer la fonction des cellules NK dans ce modèle (Peng et al., 2014).

D'autre part, une étude menée par Sun et ses collègues a montré que le clivage du ligand de NKG2D (MICA) se produit non seulement dans les tumeurs peu différenciées, mais aussi dans les tumeurs bien différenciées et les tumeurs au stade précoce. Cette libération de MICA est significativement abrogée par un inhibiteur de MMP9, suggérant ainsi que MMP9 pourrait être impliquée dans le clivage protéolytique de MICA (Sun et al., 2011). De la même manière MMP10 et 17 ont également été impliquées dans le clivage protéolytique des ligands MICA/B (Chitadze et al., 2013). Une autre étude a montré que l'activité des MMPs peut induire une régulation négative de l'expression des ligands de NKG2D (MICA, MICB, ULBP-2 et ULBP-3) *in vitro* sur un panel de cellules cancéreuses gastriques, ce qui réduit leur susceptibilité à la lyse induite par les cellules NK (Shiraishi et al., 2016). De plus, la métalloprotéinase de type membranaire MMP14 intervient dans le « shedding » de MICA. En effet, l'inhibition de l'expression de MMP14 bloque la libération de MICA et de manière concomitante, sa surexpression améliore la libération de MICA. Enfin, l'expression de MMP14 dans des cellules tumorales qui expriment MICA diminue la sensibilité de ces cellules tumorales à la lyse par les cellules NK (Liu et al., 2010).

# 5.1.2.4. Les inhibiteurs endogènes des MMPs

Une autre régulation majeure de l'activité des MMP est exercée par des antagonistes tissulaires spécifiques que sont les TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase). Souvent produits et secrétés par les mêmes types cellulaires que ceux qui produisent les MMPs, ils se retrouvent à leur côté dans le milieu extracellulaire (**figure 19**). Les TIMP constituent une famille de quatre protéines glycosylées, sécrétées, numérotées de 1 à 4, dont la taille est comprise entre 20 et 24 kDa, présentant de grandes analogies de structure mais différant par leur expression, régulation génique, caractéristiques structurales, propriétés biochimiques et leur spécificité tissulaire. Par association stoechiométrique 1:1 au site catalytique des MMPs activées, ils forment avec celles-ci des complexes non covalents, réversibles, qui les empêchent d'accéder à leurs substrats. Les TIMP inhibent toutes les MMPs et peuvent aussi réguler l'auto-activation des pro-MMPs (Lambert et al., 2004).

# 5.2. La composante cellulaire

### 5.2.1. Les cellules immunitaires

L'abondance des cellules inflammatoires et immunitaires dans les tissus et les tumeurs a été observée par les pathologistes au milieu du dix-neuvième siècle (Balkwill and Mantovani, 2001).

En effet, en 1850, Virchow a été le premier à décrire que l'inflammation (en condition chronique) pouvait promouvoir la carcinogenèse. Depuis, de nombreuses études ont apporté la preuve de ce concept. Il a été démontré des associations de cause à effet entre l'infection par *Helicobacter pylori* et le cancer de l'estomac, entre le papillomavirus humain (HPV) et le cancer du col de l'utérus, ainsi qu'entre la maladie de Crohn et le cancer colorectal (Castellsague et al., 2002). De plus, des traitements chroniques par des anti-inflammatoires non stéroïdiens réduisent les cancers (Steinbach et al., 2000). L'infiltrat immunitaire peut inclure plusieurs types cellulaires: les cellules NK, les lymphocytes B et T, les lymphocytes Treg, les MDSCs et les TAMs. Comme décrit précedemment (voir chapitre II et III), ces populations cellulaires peuvent avoir des fonctions pro-et/ou-anti-tumorales qui varient selon leur statut d'activation et leur localisation au sein de la tumeur.

### 5.2.2. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales qui participent à la structure des vaisseaux sanguins et lymphatiques sont d'origine mésenchymateuse. Ce positionnement stratégique leur permet de maintenir une barrière naturelle entre le flux sanguin et les autres couches de vaisseaux. Les vaisseaux sanguins tumoraux sont reconnus pour leur forte implication dans le processus du développement tumoral, depuis que folkman en 1971 a introduit le concept de croissance tumorale dépendante de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins appelé aussi «angiogenèse». En effet, le phénomène d'angiogenèse est nécessaire à la progression et la formation de métastases des cancers puisqu'il alimente la tumeur en oxygène et en nutriments. Par conséquent, l'hypoxie tumorale devient un facteur majeur lors de l'angiogenèse. Ainsi, plusieurs facteurs de croissance sont secrétés par les cellules tumorales comme le puissant facteur pro-angiogénique VEGF. Ces facteurs vont stimuler les récepteurs de tyrosine kinase, présents sur la surface des cellules endothéliales et favoriser ainsi la néovascularisation autour de la tumeur (Liao and Johnson, 2007). Le rôle central du VEGF dans l'angiogenèse et la progression tumorale a été le moteur de plusieurs études visant le développement de nouvelles molécules thérapeutiques telles qu'un inhibiteur du VEGF (bevacizumab) ou des inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinases du VEGF (sorafenib, sunitinib) qui bloquent la néo-vascularisation. Plusieurs essais cliniques ont montré que l'utilisation du traitement anti-angiogénique en association avec la chimiothérapie permet, dans un premier temps, une meilleure efficacité sur la survie des patients atteints de différents types de cancer (Gasparini et al., 2005), et une diminution de la taille de la tumeur. Cependant, cette amélioration est généralement suivie d'une reprise de la croissance tumorale et de la formation des métastases dues à une résistance à la thérapie (Ebos et al., 2009). Les cellules invasives peuvent également emprunter la voie lymphatique (appelée lymphangiogénèse) pour envahir les ganglions. Cette voie suit une trajectoire semblable à l'angiogenèse au cours du développement tumoral.

# 5.2.3. Les adipocytes associés aux cancers

Les adipocytes associés aux cancers (AAC) modifient la progression tumorale *in vitro* et *in vivo*. La première étude allant dans ce sens a été réalisée en 1992 et a consisté à travailler avec une lignée cellulaire murine de carcinome mammaire, la lignée SP1, ne développant pas de tumeur lorsqu'elle est injectée en sous-cutané chez la souris. Lorsque ces cellules sont co-transplantées avec des fragments de tissu adipeux mammaires ou ovariens dans le derme des souris, la croissance tumorale et la formation de métastases sont augmentées. Les auteurs de cette étude ont impliqué les estrogènes produits par le tissu adipeux dans cet effet (Elliott et al., 1992). Des modèles de culture en 2 et 3 dimensions ont ensuite permis d'attribuer un effet pro-prolifératif aux adipocytes matures. En effet, une étude utilisant un modèle de coculture 2D a montré que les cellules tumorales murines et humaines co-cultivées avec des adipocytes matures présentent des capacités invasives accrues *in vitro* et *in vivo* (Dirat et al., 2011). Il a été démontré que la sécrétion de facteurs dérivés des adipocytes (ex. la leptine) avait un rôle sur l'initiation et la progression tumorales en tant que médiateurs primaires responsables de l'augmentation de l'incidence du cancer (Vona-Davis and Gibson, 2013).

# 5.2.4. Les fibroblastes associés aux cancers

### 5.2.4.1. La réaction désmoplastique

Certains composants du stroma cités précédemment participent à une réaction induite par la présence tumorale, la réaction désmoplastique (RD). Elle est définie par le développement anormal d'un tissu fibreux en réponse à une lésion. Cette réaction est bénigne dans certains cas, mais elle peut être aussi associée à une pathologie. En effet, en réponse à l'envahissement tissulaire par des cellules cancéreuses, il s'établit une RD autour de la tumeur, qui peut être plus ou moins importante en fonction de l'organe atteint. Dans certains cas, la RD peut représenter plus de 50% de la masse tumorale. Ce processus fibrotique est induit par la présence de grandes quantités de fibroblastes péri-tumoraux qui secrètent des protéines matricielles et des enzymes protéolytiques, créant ainsi une « matrice extracellulaire permissive à la progression tumorale ». La RD est ainsi associée à un phénotype invasif caractérisé par un « turnover » matriciel dérégulé, avec une dégradation de la membrane basale riche en collagène IV et une accumulation de fibres de collagène de type I. Dans les cancers du sein, du pancréas et du poumon, il a été suggéré que les changements du microenvironnement attribué à la RD permettent une augmentation de la prolifération tumorale, l'acquisition d'un phénotype invasif et une augmentation de la chimiorésistance (Armstrong et al., 2004; De Wever and Mareel, 2003; Sethi et al., 1999). Ainsi, une RD prononcée est un facteur

indépendant de mauvais pronostic chez des patients atteints de certains cancers, comme le cancer colorectal (Conti et al., 2008; Sis et al., 2005).

# 5.2.4.2. Les fibroblastes

Virchow en 1858, et plus tard Duvall en 1879, ont utilisé des techniques d'anatomopathologie classiques et la microscopie pour décrire les cellules résidant dans les tissus conjonctifs. Les "fibroblastes" ont d'abord été définis comme des cellules présentes dans le tissu conjonctif qui synthétisent du collagène. Les fibroblastes dans les tissus normaux sont généralement des cellules uniques présents dans l'espace interstitiel ou occasionnellement près d'un capillaire, sans aucune association avec la membrane de base mais encastrés dans la MEC fibrillaire (Kalluri, 2016). Les fibroblastes ne sont ni des cellules épithéliales ni des cellules immunitaires, avec un potentiel mésenchymateux, et font partie des composantes de divers tissus (Tarin and Croft, 1969). Ils présentent une morphologie allongée (ou fusiformes). Les fibroblastes dans les tissus normaux sont généralement considérés comme indolents avec un métabolisme et une activité transcriptomique négligeables, sont dans un état quiescent ou en repos et peuvent partager plusieurs caractéristiques avec les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Kalluri, 2016). La capacité des fibroblastes quiescents à être activés a été observée pour la première fois à travers le processus de guérison des blessures (Gabbiani et al., 1971) et plus tard dans des conditions telles que l'inflammation aiguë et chronique ou pendant la fibrose (Darby et al., 2014; Desmouliere et al., 2003; Micallef et al., 2012). Le stroma normal dans la plupart des organes contient un nombre minimal de fibroblastes en association avec une matrice extracellulaire physiologique (Ronnov-Jessen et al., 1996). Dans un stroma activé, comme au cours de la progression tumorale, les fibroblastes sont beaucoup plus nombreux et sont dans un état activé, on parle alors de « fibroblastes activés » (Garin-Chesa et al., 1990).

# 5.2.4.3. Les fibroblastes activés

Durant l'inflammation, les fibroblastes se précipitent au site des blessures afin de guérir les plaies et se différencient en fibroblastes activés (que l'on appelle « myofibroblastes ») suite à la réception de signaux paracrines (comme par exemple le TGF- $\beta$ ) et commencent à exprimer des marqueurs d'activation tels que l' $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (**figure 20**). Les myofibroblastes sont caractérisés par une prolifération plus rapide et un nombre de mitose plus important, ainsi qu'une sécrétion accrue de facteurs de croissance et de modulateurs de la matrice extracellulaire en comparaison avec les fibroblases au repos (Mueller et al., 2007).



**Figure 20:** Activation des fibroblastes. a. Les fibroblastes normaux résident dans la matrice extracellulaire fibrillaire des tissus conjonctifs. Les fibroblastes interagissent avec leur environnement par l'intermédiaire d'intégrines telles que l'intégrine  $\alpha 1\beta 1$ . Ils apparaissent sous forme de cellules fusiformes avec un cytosquelette d'actine proéminent et des filaments intermédiaires de vimentine. b. Les fibroblastes peuvent acquérir un phénotype activé qui est associé à une prolifération importante et une sécrétion accrue de protéines de la MEC telles que le collagène de type I, la ténascine C et la fibronectine. D'après (Kalluri and Zeisberg, 2006).

# 5.2.4.4. Les fibroblastes associés aux cancers

Les fibroblastes associés aux cancers (CAF/Cancer Associated Fibroblasts) sont la composante cellulaire majoritaire du microenvironnement tumoral. Les CAFs partagent les même caractéristiques que les myofibroblastes, y compris un taux de prolifération élevé et une forte sécrétion de facteurs de croissance et d'autres modulateurs de la MEC (Buganim et al., 2011; Madar et al., 2013; Rasmussen and Cullen, 1998). Cependant, et contrairement aux myofibroblastes, les CAFs sont perpétuellement activés et ne retrouvent pas leur phénotype de départ, on parle ainsi d'un état stable. Ils présentent une modification de leur phénotype qui se traduit par l'apparition de l'expression de l' $\alpha$ -SMA, de la vimentine, de la desmine et de la protéine FAP (Fibroblast activated protein) (Kalluri and Zeisberg, 2006). Les CAFs sont englobés dans la matrice extracellulaire et sont largement responsables de la synthèse de cette dernière, ce qui leur confère un rôle majeur dans le remodelage de la MEC. Les CAFs sécrètent en effet des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I, II et V, la fibronectine et la laminine (Tomasek et al., 2002). De plus, ils contribuent à la formation de la membrane basale en sécrétant du collagène de type IV et des laminines (Chang et al., 2002). Ils sont également source de protéases pouvant dégrader la matrice extracellulaire créant ainsi une libération de facteurs de croissance comme le bFGF (basic fibroblast growth factor), le TGF-β, le PDGF (platelet derived growth factor), l'EGF (epidermal growth factor). Les MMPs exprimées par les fibroblastes peuvent également activer des formes latentes de

facteurs de croissance et d'autres protéases par clivage protéolytique, ce qui conduit à un remodelage de la matrice extracellulaire (**figure 21**) (Kalluri, 2016).



**Figure 21: Les fibroblastes associés aux cancers au niveau de la matrice extracellulaire. a.** Les fibroblastes au repos sont inertes dans l'espace interstitiel incorporés dans la matrice extracellulaire physiologique. **b.** En réponse à une lésion tissulaire et aux stimuli associés, les fibroblastes quiescents sont activés de manière réversible pour faciliter la réparation et la régénération. **c.** Les fibroblastes activés peuvent avoir d'autres phénotypes sécrétoires, une capacité de remodelage spécialisée de la MEC, une activation autocrine robuste et des fonctions dynamiques d'immunomodulation. D'après (Kalluri, 2016).

# 1. Origine des CAFs

L'origine de cette population est encore largement débattue, la difficulté étant que les fibroblastes associés aux cancers peuvent avoir des origines très hétérogènes (Allen and Louise Jones, 2011) (figure 22) notamment:

Les fibroblastes résidents : Les fibroblastes résidents représentent la source majeure des fibroblastes associés aux cancers. Dans le cancer du sein environ 80% des fibroblastes peuvent acquérir un phénotype activé (Sappino et al., 1988). Les arguments suggérant que les CAFs sont issus du recrutement de fibroblastes locaux proviennent essentiellement d'expériences *in vitro*. En effet, les cellules tumorales secrètent des taux importants de facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ , le PDGF et le FGF qui sont capables d'activer les fibroblastes. Ces cellules expriment alors l' $\alpha$ -SMA et se mettent à proliférer et à secréter des protéines matricielles (Denk et al., 2003; Ronnov-Jessen and Petersen, 1993). *In vivo*, les preuves concernant le recrutement de fibroblastes environnants proviennent principalement d'études sur la cicatrisation qui indiquent que de

nombreux fibroblastes situés en périphérie de la lésion prolifèrent activement et expriment des MMPs pro-migratoires (Darby et al., 1997). En effet, dans un modèle de xénogreffe de tumeur du sein, les fibroblastes mammaires humains résidents sont activés en CAFs au cours de la progression tumorale, cet effet étant attribué aux cytokines TGF- $\beta$  et CXCL-12 (aussi appelé SDF-1) (Kojima et al., 2010). Ces travaux ont été confirmés dans une étude présentant CXCL-12 comme un facteur clé impliqué dans l'activation de fibroblastes résidents dans modèle d'adénocarcinome mammaire humain (Toullec et al., 2010).

Les cellules épithéliales : Les cellules épithéliales ayant subi une transition épithéliomésenchymateuse (EMT) en réponse à des stimuli du microenvironnement peuvent être une source des CAFs (Mink et al., 2010). Ce processus induit des changements biochimiques complexes permettant aux cellules épithéliales polarisées d'adopter un phénotype mésenchymateux caractérisé par l'augmentation de leurs capacités de migration et d'invasion, ainsi que par l'augmentation de l'expression de protéines matricielles. De nombreux facteurs comme l'HGF, l'EGF, le PDGF et le TGF- $\beta$  induisent une EMT en initiant un grand nombre de voies de signalisation qui mènent, à terme, à l'activation de facteurs de transcription comme Snail, Slug, Twist et FOXC2 (Kalluri and Zeisberg, 2006). Certains arguments suggèrent néanmoins que les CAFs ne peuvent pas provenir des cellules tumorales car ils ne présentent pas ou très peu d'altérations génétiques, ce qui n'est pas le cas des cellules tumorales (Campbell et al., 2009).

Les cellules souches mésenchymateuses : Les CAFs peuvent avoir comme provenance les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les CSM sont capables de se différencier en cellules osseuses, en tissu adipeux et en cartilage. A l'origine, les CSM ont été isolées dans la moelle osseuse, mais de nombreux arguments indiquent qu'elles se situent dans tous les tissus (Crisan et al., 2008). Des modèles expérimentaux utilisant des CSM marquées ont démontré que ces cellules contribuaient à la mise en place d'un stroma tumoral activé et développaient des marqueurs des CAFs ( $\alpha$ -SMA, collagène I) (Direkze et al., 2006). De plus, les CSM en culture présentent des caractéristiques morphologiques et des propriétés semblables à des fibroblastes, et produisent des éléments de la matrice extracellulaire et des facteurs de croissance (Kalluri, 2016). Il a été également montré que les CAFs qui expriment un taux élevé de niveau de CD90 (un marqueur commun de CSM) peuvent avoir plus de potentiel de progression tumorale comparés à la sous-population qui l'exprime plus faiblement (CD90low) (Mishra et al., 2008). Cependant, cette hypothèse reste controversée car il semblerait que la tumeur ne recrute qu'un nombre très limité de cellules progénitrices (Haviv et al., 2009).

Les cellules endothéliales : Les cellules endothéliales après transition endothéliomésenchymateuse (EndMT) au niveau des régions de fibrose peuvent représenter jusqu'à 40% de fibroblastes associés aux tumeurs après exposition au TGF- $\beta$ 1 (Zeisberg et al., 2007). Ce processus est caractérisé par la perte d'expression de marqueurs endothéliaux comme CD31, l'acquisition de marqueurs comme FSP-1 et  $\alpha$ -SMA, ainsi qu'une pénétration des cellules à travers la membrane basale (Potenta et al., 2008; Zeisberg et al., 2007).

La trans-différenciation de différents types cellulaires : Les péricytes retrouvés aux alentours du site tumoral et les cellules souches dérivées des tissus adipeux peuvent également se différencier en « CAF-like ». Il a été montré que les cellules du muscle lisse sont aussi une source alternative plausible de CAFs (Dulauroy et al., 2012; Jotzu et al., 2010).



Figure 22: Les multiples origines des CAFs dans le stroma tumoral. Les fibroblastes associés aux cancers sont une population très hétérogène. Cinq mécanismes possibles sont décrits pour expliquer l'origine des CAFs: l'activation de fibroblastes résidents, la transdifférenciation de péricytes, le recrutement de cellules souches mésenchymateuses, la transition éptithélio-mésenchymateuse de cellules épithéliales, la transition endothélio-mésenchymateuse. D'après (Xing et al., 2010).

### 2. Activation des fibroblastes dans le microenvironnement tumoral

## a) Les altérations génétiques

Les fibroblastes pourraient acquérir leur état « activé » et le maintenir par plusieurs mécanismes notamment suite à des mutations génétiques. En effet, les fibroblastes associés aux cancers pourraient être génétiquement distincts des fibroblastes normaux et plusieurs études ont suggéré la présence de mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *TP53* et *PTEN* et au

niveau d'oncogènes tel que c-Myc. Il a été également suggéré des pertes d'hétérozygotie (LOH) et des changements du nombre de copies de gènes au niveau des cellules stromales associées aux cancers (Kurose et al., 2002; Patocs et al., 2007; Wernert et al., 2001). Cependant, il existe une controverse quant à la présence d'altérations génétiques au niveau des CAFs. En effet, d'autres études plus récentes ont clairement montré que les populations de CAFs sont génétiquement stables et ne présentent aucune anomalie du caryotype ni de mutations de p53 (Hosein et al., 2010; Wernert et al., 2001). Les altérations génétiques ne sont donc sans doute pas un facteur clé pour l'activation des CAFs.

# b) Les altérations épigénétiques

Des données émergentes suggèrent que l'activation irréversible des fibroblastes pourrait être induite par des altérations épigénétiques (Li et al., 2015; Mrazek et al., 2014; Tampe and Zeisberg, 2014; Zeisberg and Zeisberg, 2013). Des études portant sur des tumeurs du sein montrent que les cellules stromales (présumément les fibroblastes) présentent des changements épigénétiques qui ne sont pas observés au niveau des fibroblastes des tissus mammaires normaux (Hu et al., 2005). En effet, des différences de méthylation des îlots CpG entre les CAFs et les myofibroblastes ont été observées. Il a été ainsi montré que la surexpression de régulateurs épigénétiques au sein du stroma conduit à l'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine au niveau des CAFs ce qui induit des lésions néoplasiques des cellules épithéliales adjacentes (Fu et al., 2011; Zong et al., 2012). De plus et de manière intéressante, des travaux récents ont montré que l'exposition à la cytokine proinflammatoire LIF (Leukemia inhibitory factor) initie un switch épigénétique conduisant à l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK1/STAT3, ce qui entraine une activité proinvasive soutenue des CAFs. En effet, l'histone acétyltransférase p300 acétyle STAT3. Cette dernière active ensuite la méthyltransférase DNMT3b qui induit la méthylation des îlots CpG du promoteur de la phosphatase SHP-1 et abroge ainsi son expression, ce qui conduit à la phosphorylation constitutive de JAK1 (Albrengues et al., 2015).

# c) L'effet persistant du microenvironnement

Les signaux exogènes conduisant à l'activation des fibroblastes dans le microenvironnement tumoral sont nombreux et probablement distincts dans différents types de tumeurs. Un ensemble de facteurs de croissance et de cytokines, spécifiques à chaque type de tumeur peut activer les fonctions anti-invasives ou pro-invasives des fibroblastes associés au cancer. L'origine cellulaire et les taux de production des molécules régulatrices des CAF peuvent également être modulés. Les études *in vitro* et les mesures associées à l'activation des fibroblastes reposent sur des facteurs d'activation des fibroblastes couramment utilisés tels que le TGF- $\beta$ , les protéines osseuses

morphogénétiques (BMP), le PDGF, l'EGF, le FGF et la protéine Sonic Hedgehog (SHH) (Kalluri, 2016). De plus, le facteur inhibiteur de leucémie (LIF) a été impliqué dans l'acquisition de propriétés contractiles et invasives par les CAFs (Albrengues et al., 2014). Dans le cancer du sein, la production accrue de WNT-7a par des cellules cancéreuses invasives peut améliorer la signalisation du récepteur TGF-β associée aux propriétés invasives des CAFs (Avgustinova et al., 2016). Il a également été démontré dans un modèle d'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), que l'activation du récepteur de la vitamine D peut atténuer le sécrétome des CAFs impliqué dans la promotion des tumeurs (Sherman et al., 2014). Dans les lésions néoplasiques précoces, l'IL-1β induit les voies de signalisation NF-κB dans les fibroblastes, ce qui améliore potentiellement leurs fonctions pro-inflammatoires et de promotion des tumeurs (Erez et al., 2010). Plusieurs autres facteurs tels que le TNF-a libérés par les cellules tumorales induisent également l'activation des CAFs (Mueller et al., 2007; Tjomsland et al., 2011). De plus, il a été montré que les cellules cancéreuses induisent la diminution d'expression de *p16INK4A* au niveau des CAFs ce qui est important pour leur activation (Tjomsland et al., 2011). Barone et ses collègues ont d'autre part montré que la communication bidirectionnelle entre les cellules cancéreuses du sein et les CAFs, par l'intermédiaire de facteurs comme la leptine, conduit également à leur activation et à la progression tumorale (Barone et al., 2012). D'autre part et de façon intéressante, il a été montré que les caractéristiques uniques des CAFs sont maintenues même en l'absence de contact avec les cellules tumorales. Ceci indique que l'effet des CAFs sur la progression tumorale n'est pas simplement une réponse cellulaire induite par les facteurs secrétés par les cellules tumorales, mais résulte également de nouvelles propriétés acquises (Orimo et al., 2005).

# 3. Identification phénotypique des CAFs

En dépit des nombreuses publications illustrant le rôle des CAFs dans la progression tumorale, il existe une certaine ambiguïté quant à l'identification de ces cellules au sein du tissu tumoral. Encore une fois, la difficulté provient du fait que les CAFs représentent une population cellulaire hétérogène avec différentes origines (Allen and Louise Jones, 2011; Xouri and Christian, 2010). Pendant de nombreuses années, les CAFs ont été identifiés uniquement par leur niveau d'expression de l' $\alpha$ -SMA. Cependant, des analyses immuno-histochimiques ont démontré une absence d'expression de ce marqueur dans certains fibroblastes péri-tumoraux (Andarawewa et al., 2005). A ce jour, l'identification de ces cellules repose donc sur leurs caractéristiques morphologiques ainsi que sur l'expression de certains marqueurs :

La protéine FSP-1 (fibroblast-specific protein 1, aussi appelé S100A4) est exprimée à la fois par les CAFs et par les cellules cancéreuses au cours de la progression tumorale (Ambartsumian et al.,

1996). C'est une protéine liant le calcium, capable d'interagir avec des partenaires intra et extracellulaires. Dans la cellule, elle peut interagir et inactiver la protéine p53. Elle se lie également avec les filaments d'actine, la myosine ou la tropomyosine, influençant ainsi le cytosquelette et régulant la motilité cellulaire (Helfman et al., 2005). FSP-1 est également pro-angiogénique, probablement à travers l'activation du plasminogène ou la surexpression de métalloprotéases comme MMP-13 (Egeblad et al., 2005). De nombreuses preuves indiquent ainsi que FSP-1 est un facteur crucial régulant le potentiel métastatique des tumeurs. En effet, les cellules cancéreuses injectées à des souris sauvages deviennent métastatiques, mais forment moins de tumeurs et aucune métastase lorsqu'elles sont injectées à des souris FSP-1<sup>-/-</sup>. De plus, la co-injection de fibroblastes FSP-1<sup>+/+</sup> avec les cellules tumorales induit le développement tumoral et la formation de métastases dans les souris FSP-1<sup>-/-</sup> (Grum-Schwensen et al., 2005). Ceci suggère que FSP-1, lorsqu'elle est secrétée par les fibroblastes, altère le microenvironnement, le rendant favorable à la progression tumorale.

La protéine  $\alpha$ -SMA: L'actine des muscles lisses est l'isoforme de l'actine qui prédomine dans le système vasculaire et joue un rôle important dans la fibrogénèse, et il a même été montré que l' $\alpha$ -SMA était présente dans les fibroblastes de tissus sous-cutanés murins en l'absence de lésion tissulaire (Storch et al., 2007). En utilisant certaines des protéines cytosquelettiques qui sont normalement présentes dans les cellules des muscles lisses, en particulier l' $\alpha$ -SMA, les CAFs peuvent se contracter (Jiroutova et al., 2005). Ainsi, en exprimant l' $\alpha$ -SMA, les fibroblastes se différencient partiellement vers un phénotype de cellules du muscle lisse, leur activation jouant un rôle clé dans la contractilité et le développement de la réponse fibrotique (Elberg et al., 2008).

La protéine FAP/Seprase est une sérine protéase possédant une activité enzymatique peptidasecollagénase *in vitro* (Park et al., 1999). La surexpression de cette protéine dans les cellules tumorales induit la tumorigenèse et une croissance tumorale importante (Cheng et al., 2002). Dans les fibroblastes péri-tumoraux, FAP est cruciale pour le remodelage de la MEC et permet l'invasion des cellules tumorales grâce à son activité enzymatique (Lee et al., 2011). Santos et ses collègues ont montré que le ciblage de FAP inhibe la stromagenèse et la croissance tumorale chez les souris (Santos et al., 2009). Cependant le rôle de FAP dans le mélanome est controversé du fait de la présence d'un taux modéré de fibroblastes qui expriment cette protéine (Huber et al., 2003).

D'autres marqueurs caractérisent les CAFs tels que: vimentine, desmine, collagène I, PDGFR  $\alpha/\beta$ , NG2 (Neuron-glial antigen2), ténascine C, périostine, podoplanine ainsi que l'absence d'expression des marqueurs endothéliaux (CD31) et épithéliaux (E-cadhérine) (Sugimoto et al., 2006).

# 4. Polarisation des CAFs

Les fibroblastes présents dans le stroma tumoral ont majoritairement une fonction pro-tumorale. Ils stimulent la survie des cellules cancéreuses, la croissance et l'invasion, améliorent la rigidité de la matrice extracellulaire, contribuent à l'angiogenèse par la libération de facteurs pro-angiogéniques, contribuent à l'instauration d'un environnement pro-inflammatoire, et impactent sur l'activation de cellules immunitaires variées (décrit ci-après). Des données plus récentes montrent cependant que les CAFs peuvent également présenter des effets suppresseurs de tumeur. Néamoins, les mécanismes conduisant à cet effet ne sont pas connus, mais l'effet suppresseur de tumeur pourrait être inhérent à un effet direct sur l'inhibition de croissance des cellules cancéreuses et sur la modulation du comportement des cellules immunes (**figure 23**) (Augsten, 2014).



Figure 23: Effets pro et anti-tumoraux des CAFs. Les CAFs présents au niveau du stroma avec une fonction protumorale sont prédominants (indiqué en rouge). Ils stimulent la survie, la croissance et l'invasion des cellules et contribuent au remodelage de la MEC. Ils contribuent à l'angiogenèse par la libération de facteurs pro-angiogéniques ainsi qu'à l'apparition d'un milieu inflammatoire. Une description plus récente démontre que les fibroblastes résidents (indiqué en jaune) peuvent conférer des effets suppresseurs de tumeurs mais les mécanismes sous-jacents de ce phénotype inhibiteur ne sont pas connus mais pourraient impliquer la modulation des fonctions des cellules immunitaires. D'après (Augsten, 2014).

En effet, en fonction du type des signaux, les fibroblastes intra-tumoraux peuvent se polariser en adoptant des états d'activation différents. Les fibroblastes de type II (F2) se différencient en fibroblastes pro-tumoraux sous par exemple l'influence de facteurs de croissance et de chimiokines (appelés "inducteurs"). La signalisation induite par CXCL14, hedgehog (Hh) ou le TGF- $\beta$  active des facteurs de transcription qui induisent un programme de contrôle de l'expression d'une variété de molécules "effectrices" (les composants de la matrice, les facteurs de croissance, et les cytokines) qui à leur tour, entrainent des effets pro-tumoraux en stimulant d'autres cellules du MET. En revanche, les fibroblastes de type I (F1) expriment des molécules tels que Wnt3a et Slit2 et ont

donc des effets inhibiteurs sur cellules cancéreuses. Les signaux exogènes et les facteurs de transcription impliqués dans l'établissement du phénotype suppresseur de tumeur ne sont pas clairement connus mais il semble que le TNF- $\alpha$  et le LPS (lipopolysaccharide) qui stimulent l'expression de Wnt3a et des chimiokines, respectivement, puissent être des inducteurs potentiels des CAFs de type I (**figure 24**) (Qadir et al., 2011).



**Figure 24: Polarisation des CAFs**. Les fibroblastes intra-tumoraux peuvent se polariser en deux états d'activation différents : les fibroblastes pro-tumoraux de type II (F2) sous l'influence de facteurs de croissance et de chimiokines ou les fibroblastes de type I (F1) qui ont des effets inhibiteurs de la croissance tumorale. D'après (Qadir et al., 2011).

# 5. Implication des CAFs dans la progression tumorale

Les premiers travaux portant sur le rôle des fibroblastes dans la progression tumorale ont eu lieu à la fin des années 1980 et ont consisté à co-injecter à des souris immuno-déficientes des fibroblastes avec des cellules tumorales. Ces travaux ont ainsi mis en évidence l'impact important des fibroblastes sur le développement et la croissance de la tumeur (Camps et al., 1990; Picard et al., 1986). Par la suite, de nombreuses preuves expérimentales ont démontré une contribution de ces cellules dans l'initiation du cancer, dans la progression tumorale à travers la sécrétion de facteurs de croissance et de chimiokines et dans l'invasion et le processus de formation de métastases (Kalluri and Zeisberg, 2006).

# 5.1. Rôle des CAFs dans l'initiation du cancer

Les CAFs ont un phénotype modifié et jouent par conséquent un rôle important dans la promotion des cancers. En effet, les fibroblastes cutanés isolés à partir de patients atteints de cancer du sein, de mélanome malin, de polypose adénomateuse familiale, de rétinoblastome et des tumeurs de Wilms montrent un taux de prolifération augmenté in vitro, ce qui indique que le comportement de ces fibroblastes modifiés peut augmenter le taux d'initiation des cancers (Kopelovich, 1982; Schor et al., 1986). Plusieurs études qui ont utilisé des modèles murins portant des fibroblastes génétiquement modifiés ont démontré une implication directe des fibroblastes résidents dans l'apparition du cancer. Une étude utilisant la capacité des cellules épithéliales mammaires humaines à former un canal dans le stroma mammaire de souris (Kuperwasser et al., 2004), a également démontré que la surexpression de TGF-B et/ou du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) dans des fibroblastes de souris induit l'initiation d'un cancer du sein à l'intérieur de l'épithélium humain normal. Un autre lien entre les facteurs de croissance des CAFs et l'initiation tumorale a été d'autre part mis en évidence par des études qui ont comparé l'effet de fibroblastes normaux et de CAFs isolés du site de la tumeur primitive (Orimo et al., 2005; Shimoda et al., 2010). Quand les cellules épithéliales « normales » de prostate transformées par le virus simien 40 (SV40) ont été greffées à des souris en combinaison soit avec des fibroblastes normaux ou des CAFs, seuls les CAFs ont conduit à l'émergence de lésions ressemblant à une néoplasie intra-épithéliale de prostate (Shimoda et al., 2010). Ces résultats indiquent que les fibroblastes normaux sont nécessaires pour maintenir l'homéostasie épithéliale, alors que les CAFs initient et promeuvent les altérations tumorigèniques au niveau des cellules épithéliales.

# 5.2. Rôle des CAFs dans la croissance tumorale

Les CAFs contribuent largement au développement des cancers par différents mécanismes importants dans la croissance tumorale. En effet, les CAFs orchestrent les processus physiopathologiques clés dans le développement du cancer par des interactions paracrines (Ohlund et al., 2014).

Des facteurs solubles sécrétés de manière importante par les CAFs ont été impliqués dans le « crosstalk » paracrine et favorisent la croissance tumorale par l'activation de voies de prolifération. Parmi ces facteurs on retrouve le TGF- $\beta$ , le HGF, le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF), l'EGF, le facteur de croissance insuline-like (IGF), le facteur de croissance FGF, le VEGF et des membres de la famille Wnt (Allinen et al., 2004; Bhowmick et al., 2004; Chaffer and Weinberg, 2011; Cirri and Chiarugi, 2011; Erez et al., 2010; Guo et al., 2008; Kalluri and Zeisberg, 2006; Orimo et al., 2005; Rasanen and Vaheri, 2010), ainsi que de nombreuses cytokines et des chimiokines telles que CCL7, CXCL12 et CXCL14 (Augsten et al., 2009; Jung et al., 2010; Orimo et al., 2005) (**figure 25**).

L'équipe de R. Weinberg a également montré que des fibroblastes isolés du stroma d'un carcinome mammaire invasif augmentent significativement la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe, comparés à des fibroblastes normaux. En fait, les CAFs produisent des taux élevés de la chimiokine CXCL-12/SDF1 qui, d'une part, recrute les progéniteurs endothéliaux dans la tumeur pour favoriser l'angiogenèse et, d'autre part, augmente la croissance tumorale *via* sa liaison avec son récepteur CXCR-4 exprimé à la surface des cellules tumorales (Orimo et al., 2005). De plus, des études ont montré que les CAFs peuvent générer des ROS dans un environnement hypoxique et à faible pH qui agissent comme des mutagènes pour les cellules avoisinantes, et peuvent également recruter des cellules souches cancéreuses (CSC) par la création de niches tumorales (Grum-Schwensen et al., 2005; Kuperwasser et al., 2004; Sneddon and Werb, 2007).





# 5.3. Rôle des CAFs dans le métabolisme des cellules tumorales

De façon très intéressante, les CAFs ont également un rôle dans la régulation du métabolisme des cellules tumorales. Les cellules tumorales dégradent le glucose uniquement grâce à la glycolyse, aboutissant à la production de lactate (appelé effet Warburg), alors que les cellules normales catabolisent entièrement cette molécule à travers la phosphorylation oxydative (Jones and Thompson, 2009). L'intérêt de l'effet Warburg n'est pas clair car il aboutit à une diminution de la

production d'ATP, ce qui semble être défavorable à la cellule tumorale. Cependant, des arguments suggèrent que les cellules tumorales pourraient s'en servir pour fournir des macromolécules intermédiaires nécessaires à la formation des nouvelles cellules et ainsi faciliter leur prolifération (Vander Heiden et al., 2009). Dans ce cadre, les fibroblastes péri-tumoraux semblent participer au métabolisme complexe des cellules tumorales. En effet, les CAFs produisent du lactate et du pyruvate, des métabolites énergétiques utilisés par les cellules cancéreuses dans le cycle de Krebs et la production d'ATP. Les CAFs semblent donc « nourrir » littéralement la tumeur (Pavlides et al., 2009). L'effet Warburg accru dans les CAFs semble également être associé à une activité catabolique importante et à une induction d'autophagie (Chaudhri et al., 2013; Guido et al., 2012; Martinez-Outschoorn et al., 2014).

# 5.4. Rôle des CAFs dans l'angiogenèse

L'équipe de D. Rowley a montré que des CAFs capables d'induire la tumorigenèse dans des modèles de tumeurs prostatiques secrètent des taux plus importants de facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) que des fibroblastes normaux (Yang et al., 2005). Cette protéine est surexprimée dans de nombreux cancers incluant le cancer du sein, du pancréas et de l'œsophage (Allen and Louise Jones, 2011). En utilisant un modèle de xénogreffe, cette équipe a montré que le CTGF du stroma tumoral induit une augmentation significative de l'angiogenèse et augmente la croissance tumorale. Le traitement de fibroblastes normaux par du TGF- $\beta$  conduit à la sécrétion de CTGF et à l'acquisition d'une activité pro-tumorale (Yang et al., 2005). Les CAFs peuvent également promouvoir l'angiogenèse en sécrétant des niveaux élevés de VEGF et en recrutant des cellules progénitrices endothéliales (CPE) dans le stroma tumoral par la sécrétion de SDF-1 (Orimo et al., 2005).

# 5.5. Rôle des CAFs dans le processus métastatique

Les CAFs peuvent favoriser la formation de métastases en libérant des facteurs de croissance et des cytokines dans le MET et être impliqués, indirectement ou directement, dans la croissance et l'invasion des cellules cancéreuses à des sites distants (Bruzzese et al., 2014; Elkabets et al., 2011; Scherz-Shouval et al., 2014). En effet, les fibroblastes associés aux métastases (MAF) qui représentent une variante des CAFs, expriment la ténascine C et le VEGFA qui sont des médiateurs clés de la métastase du mélanome aux poumons (O'Connell et al., 2011). De plus, l'induction de l'angiogenèse suite à l'activation de cellules étoilées (qui sont des fibroblastes résidant au niveau du foie) favorise l'apparition de métastases du mélanome au niveau du foie (Olaso et al., 1997). Dans le cancer colorectal, les CAFs stimulés par le TGF-β1 sécrètent de l'IL-11 pour améliorer la survie des cellules cancéreuses colorectales et augmenter la colonisation des organes (Calon et al., 2012).

Pena et al ont montré que les CAFs stimulés par le PDGF augmentent l'invasion des cellules de cancer colorectal ainsi que la formation de métastases à distance par la sécrétion de stanniocalcine 1 (STC1) (Pena et al., 2013). Les CAFs sécrètent aussi excessivement des MMPs qui dégradent la MEC et conduisent à l'invasion des cellules cancéreuses (Brundula et al., 2002). En effet, les fibroblastes activés produisent MMP1 et la stromelysine-1 (MMP3), cette dernière clivant la Ecadhérine, induisant ainsi l'EMT et l'invasivité des cellules cancéreuses dans les régions adjacentes (Boire et al., 2005; Lochter et al., 1997). Les exosomes dérivés des fibroblastes sont également des médiateurs positifs de la progression du cancer et le remodelage du stroma, par leur régulation de l'activité des fibroblastes (Borges et al., 2013; Hu et al., 2015; Kahlert and Kalluri, 2013). De manière intéressante, il a été montré que les fibroblastes qui n'expriment pas les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases TIMP génèrent des exosomes avec une expression élevée de MMPs et d'ADAM10, favorisant la motilité accrue des cellules cancéreuses (Shimoda et al., 2014). Il a également été montré que la formation de métastases hépatiques après injection de cellules de mélanome B16 chez les souris est associée à l'activation de cellules allongées avant même que la tumeur ait atteint un diamètre de 150 µm (Olaso et al., 1997). Une autre étude a évalué l'effet des fibroblastes sur la prolifération des cellules de mélanome, où il a été montré que les cellules qui ont métastasé sont celles qui sont influencées par les fibroblastes (Olaso et al., 2003). Cela indique que des stimuli spécifiques fournis par les fibroblastes créent des niches qui favorisent la croissance de cellules cancéreuses à des sites distants. Les cellules tumorales et cellules hématopoïétiques « éduquent » ainsi les CAFs dans les sites secondaires pour former des niches métastatiques (Elkabets et al., 2011; Malanchi et al., 2011). Les CAFs sont doués de capacités migratoires et de motilité qui sont exploitées par les cellules tumorales (Gaggioli, 2008). Une autre étude suggère que dans des conditions hypoxiques, les cellules tumorales expriment plus CXCR4, leur permettant de se rapprocher des CAF qui sécrètent CXCL12/SDF-1, ce qui facilite leur échappement vers un environnement normoxique (Raman et al., 2007). De manière intéressante, il a été également montré que les exosomes secrétés par les CAFs jouent un rôle clé dans la promotion des cancers, la motilité des cellules cancéreuses et les métastases via l'activation de la voie autocrine Wnt-PCP au niveau des cellules cancéreuses (Luga et al., 2012). L'équipe de Malanchi a aussi constaté que la périostine (Postn), un composant de la MEC, est exprimée par les fibroblastes dans le tissu normal et dans le stroma des tumeurs primaires. Les cellules tumorales ont besoin d'induire l'expression de la Postn stromale pour initier la colonisation des poumons par les cellules souches cancéreuses (CSC/ Cancer Stem Cell). En effet, la Postn est nécessaire pour permettre l'entretien des CSC, et le blocage de sa fonction empêche les métastases. La Postn recrute les ligands de Wnt et, par conséquent, augmente la signalisation Wnt dans des CSC (Malanchi et al., 2011).

L'ensemble de ces études a montré que les CAFs sont abondants au niveau des sites primaires permettent la transition de tumeurs *in situ* vers des tumeurs invasives.

# 5.6. Rôle des CAFs dans la résistance aux thérapies

Des études ont souligné le rôle du microenvironnement spécifique d'organes dans la résistance aux drogues de chimiothérapie (Fidler et al., 1994), et les CAFs sont apparus comme des acteurs clés de la résistance aux thérapies anti-cancéreuses. En effet, une signature génétique spécifique du stroma associée à une chimiorésistance au 5-fluorouracile, à l'épirubicine et au cyclophosphamide dans le cancer du sein (Farmer et al., 2009) a été montrée. Ces études impliquent les CAFs comme promoteurs de la résistance aux thérapies. Les mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux impliquant le stroma incluent ainsi la modulation des voies d'interaction entre la cellule cancéreuse et la MEC, l'adhésion CAF-MEC et des voies de signalisation médiées par les cytokines ou les chimiokines (Meads et al., 2009; Paraiso and Smalley, 2013). Les CAFs peuvent également participer à la pression de fluide interstitielle intra-tumorale inhibant indirectement l'absorption de médicaments anticancéreux (Heldin et al., 2004). D'autres études ont suggéré que la modulation immunitaire, les actions pro-angiogéniques et la reprogrammation métabolique du MET médiées par les CAFs pourraient aider à la survie des cellules cancéreuses et faciliter l'échappement à la thérapie (Correia and Bissell, 2012; Dittmer and Leyh, 2015; Ohlund et al., 2014). Les CAFs dans les mélanomes mutés BRAF peuvent également participer à la résistance à l'inhibiteur de BRAF en créant une MEC riche en fibronectine qui active la voie ERK médiée par la kinase d'adhésion focale (FAK), ce qui compense l'action de l'inhibiteur de BRAF dans les cellules cancéreuses (Hirata et al., 2015). De tels programmes médiés par les CAFs favorisent ainsi la prolifération de clones résistants. De plus, l'adhésion des cellules cancéreuses aux CAF peut également conférer une résistance aux médicaments, éventuellement par la liaison homotypique de N-cadhérine et une activation de la voie de prolifération AKT dans les cellules tumorales (Flach et al., 2011; Li et al., 2001). De plus, il est intéressant de noter que le gain de propriétés de remodelage de la MEC par les CAFs peut conduire à une résistance thérapeutique (Chang and Mani, 2013; Mitra et al., 2015; Sui et al., 2014).

Il a été montré que les CAFs pouvaient également contourner le traitement par des anti-VEGF en activant la voie du PDGF-C qui active les voies MAPK et PI3K/AKT (Crawford et al., 2009; Straussman et al., 2012). En effet, Meads et ses collègues ont montré que les CAFs peuvent conférer une résistance aux thérapies anticancéreuses par la sécrétion de facteurs solubles (Meads et al., 2009). Dans ce contexte, le TGF- $\beta$ , l'IL-6 et le HGF produits par les CAFs sont des médiateurs potentiels de résistance aux médicaments. En effet, le TGF- $\beta$  peut induire des programmes

mésenchymateux dans les cellules tumorales, permettant leur adhésion à la MEC. Quant à lui, l'IL-6 produit par les CAFs induit une cascade de signalisation pro-survie (Kumari et al., 2016). Le HGF est également un modulateur clé de la résistance médiée par les CAF aux inhibiteurs des récepteurs de la tyrosine kinase (Wilson et al., 2012). Il a été montré que le HGF dérivé des CAFs favorise la résistance dans des modèles précliniques de cancers traités avec des inhibiteurs de BRAF (Straussman et al., 2012) ou des inhibiteurs du récepteur EGFR (Wang et al., 2009). Ainsi, un contrôle du sécrétome des CAF qui confère cette résistance aux médicaments anticancéreux serait nécessaire pour mieux prédire la valeur de ciblage des CAFs pour l'intervention clinique. Plusieurs stratégies et combinaisons sont également testées en clinique pour surmonter la résistance aux médicaments médiée par les CAFs (Meads et al., 2009).

# 5.7. Rôle des CAFs dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale

Les fibroblastes associés aux cancers ont également été impliqués dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale innée et adaptative notamment par la sécrétion de divers facteurs dans le microenvironnement tumoral (**figure 26**).

## 5.7.1. Les CAFs et la réponse immune innée

Il a été montré que les CAFs sécrètent plusieurs chimiokines impliquées dans l'inflammation et le recrutement de cellules immunitaires innées, telles que des monocytes, des mastocytes et des neutrophiles, et leur acquisition d'un phénotype immunosuppresseur et pro-tumoral (Harper and Sainson, 2014). Les CAFs peuvent avoir un rôle dans l'inflammation et parmi les gènes hautement exprimés au niveau des CAFs, on retrouve la cyclo-oxygenase-2 (COX-2) qui est jusqu'à six fois plus exprimée au niveau des CAFs que des fibroblastes normaux, ce qui induit une sécrétion plus importante de prostaglandine E2 (PGE2) (Mueller et al., 2007). Une étude récente de Herrera et ses collègues sur le rôle des CAFs dans le cancer du côlon a également suggéré que la combinaison de signature des CAFs et des macrophages M2 corrèle avec une claire différence dans la progression de la maladie et la survie chez des patients de stade avancé, ce qui suggère une association entre ces deux types cellulaires (Herrera et al., 2013). En outre, les CAFs dérivés du cancer de prostate peuvent induire un phénotype immunosuppressif au niveau des macrophages via SDF-1 (Comito et al., 2014). Il a également été montré que l'IL-6 dérivé des CAFs oriente la différenciation des monocytes vers des macrophages plutôt que vers les DC, et recrute et active les mastocytes. De plus, plusieurs études ont montré que les CAFs co-cultivés avec des cellules tumorales expriment CCL2/MCP-1 (monocyte chimoattractant protein 1) (Lin et al., 2012; Wu et al., 2011). MCP-1 est une chimiokine impliquée dans l'attraction des macrophages dans le microenvironment tumoral et dans l'induction de leur différentiation en macrophages immunosuppresseur de type M2 (Roca et al., 2009). En effet, chez les souris portant les cellules tumorales 4T1 dans lesquelles le gène *Mcp-1* a été délété, une diminution significative de macrophages positifs pour le marqueur F4/80 a été observée dans les tumeurs (Yoshimura et al., 2013).

D'autre part, des expériences *in vitro* ont montré que les cultures primaires de CAFs co-cultivés avec des cellules de carcinome oral à cellules squameuses ont un profil d'expression de cytokines pro-inflammatoires caractérisé par l'augmentation de la régulation de nombreuses chimiokines et cytokines y compris CCL7, CXCL1, CXCL2 et CXCL8, qui sont associées au recrutement de cellules myéloïdes et de neutrophiles favorisant ainsi la progression tumorale (Acharyya et al., 2012). De manière similaire, une étude décrivant le sécrétome des CAFs *in vitro* a aussi identifié des facteurs régulant la réponse inflammatoire tels que les chimiokines SDF-1 et RANTES/CCL5, ainsi que des protéines anti-inflammatoires telles que CXCL6/GCP-2 (De Boeck et al., 2013). Alors que SDF-1 et RANTES sont impliqués dans la progression tumorale par leur potentiel chimioattractant et l'activation de leucocytes, CXCL6 et CXCL8 sont impliqués dans le recrutement de neutrophiles.

Les fibroblastes associés au mélanome interfèrent également fortement avec les fonctions des cellules NK, notamment par la modulation du phénotype des NK, de leur cytotoxicité et de la production de cytokines. Ainsi, l'expression de surface des récepteurs activateurs NKp44, NKp30 et DNAM-1 induite par l'IL-2 et la libération de granules cytolytiques ont été inhibées dans les cellules NK par la présence de CAFs, ce qui entraine une altération de la lyse des cellules de mélanome induite par les cellules NK. En effet, les cocultures en « transwell » et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ont montré que le contact cellule tumorale-CAF était nécessaire pour induire la modulation de l'expression de DNAM-1. En revanche, la modulation de NKp44 et NKp30 semble due à PGE2 libérée par les fibroblastes pendant la coculture (Balsamo et al., 2009). Li et al ont également montré que PGE2 est produite de manière importante par les CAFs et joue un rôle dominant dans l'orchestration de l'activité des cellules NK. Dans d'autres expériences de coculture, les CAFs diminuent non seulement l'expression des récepteurs activateurs des NK, de la perforine et du granzyme B, mais ils inhibent également la sécrétion des cytokines TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ par les NK après reconnaissance de cellules tumorales de carcinome colorectal (Li et al., 2013). De plus, la sécrétion de PGE2 et d'IDO module la fonction des NK dans le carcinome hépatocellulaire et atténue la cytotoxicité anti-tumorale (Li et al., 2012).

# 5.7.2. Les CAFs et la réponse immune adaptative

Les CAFs sont impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire adaptative. Cependant, le problème de l'étude de l'interaction entre les CAFs et les cellules immunitaires adaptatives réside en l'absence de tests multicellulaires complexes in vitro (Harper and Sainson, 2014). Il est bien admis que le TGF-\beta1 et TGF-\beta2 sont fortement s\u00e9cr\u00e9t\u00e9s par les CAFs, et que ces facteurs sont importants pour maintenir le phénotype fibroblastique activé par un « feedback » de TGF-β via Smad 2/3 (Kuperwasser et al., 2004). La présence de TGF-β dans le microenvironnement tumoral est bien connue pour inhiber les cellules immunes anti-tumorales (Nazareth et al., 2007). En effet, la sécrétion de TGF-ß par les CAFs affecte potentiellement la biologie des cellules dendritiques en inhibant leur migration, leur maturation et les capacités de présentation de l'antigène et peut augmenter le nombre de lymphocytes Treg au sein du microenvironnement tumoral par l'induction de l'expression de FOXP3 (Flavell et al., 2010) ou interférer avec la fonction des lymphocytes T cytotoxiques à l'intérieur de la tumeur (Thomas and Massague, 2005). La sécrétion de TGF-ß par les CAFs peut également atténuer également la production d'IFN-y par les cellules NK (Laouar et al., 2005), ainsi que l'expression des récepteurs activateurs des NK, y compris NKG2D, NKp30 et NKp44 (Flavell et al., 2010). Le TGF-β régule une myriade de réponses immunosuppressives (Wan and Flavell, 2007), et des études récentes ont également impliqué le TGF-ß dans la différenciation des lymphocytes en (Th17) (Bailey et al., 2014), ajoutant une complexité supplémentaire aux fonctions immunomodulatrices du TGF-B dérivé des CAFs (Li et al., 2006). Sur la base d'évaluations in vitro, il a été montré que la production d'IL-4, IL-6 et IL-8 par les CAFs peut induire une différenciation cellulaire en MDSCs (Kim et al., 2012; Paunescu et al., 2011). De même, la sécrétion de VEGF par les CAFs peut affecter les fonctions des DC et augmenter l'infiltration des Treg et des MDSCs au niveau de la tumeur (Voron et al., 2014). De plus, un mauvais pronostic des patients porteurs de tumeurs démoplastiques, comme le cancer pancréatique, est associé à un phénotype immunosuppresseur de type Th2. Or, la sécrétion de la cytokine TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) par les CAFs est imliquée dans la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> en profil Th2 qui soutient la différenciation des lymphocytes B (De Monte et al., 2011).

De manière intéressante, il a été également montré que les fibroblastes de colon humain normaux et des CAFs dérivés de patients atteints de cancer du poumon cultivés *in vitro* expriment les régulateurs négatifs de la réponse immunitaire, PDL1 et PDL2, qui ont un impact potentiel sur l'activation des cellules T (Nazareth et al., 2007; Pinchuk et al., 2008).



Figure 26: La modulation du système immunitaire inné et adaptatif par les CAFs. L'activation autocrine et paracrine des CAFs donne lieu à une libération dans le stroma de cytokines et de chimiokines (notamment induite par la voie NF- $\kappa$ B). Ces molécules ciblent plusieurs types de cellules immunitaires et ont des fonctions immuno-suppressives à la fois sur les globules blancs de la réponse innée et adaptative. D'après (Harper and Sainson, 2014).

Ces résultats mettent en évidence l'action des CAFs à divers niveaux de la réponse immune antitumorale dans le microenvironnement. Néanmoins, d'autres études sont clairement nécessaires pour élucider pleinement le rôle complexe des CAFs dans l'induction d'une immunosuppression, notamment leur rôle sur les cibles tumorales de la réponse immunitaire.

En conclusion, les populations hétérogènes de CAFs sont des acteurs clés du stromal tumoral, et contribuent à l'initiation et la progression maligne, en remodelant la MEC et en orchestrant différents mécanismes par la sécrétion de divers facteurs solubles (Gascard and Tlsty, 2016). De plus, il existe un autre élément clé du microenvironnement tumoral qui est l'hypoxie que je vais donc présenter dans le chapitre suivant.

# V. L'hypoxie tumorale

## 1. Définition

L'hypoxie se caractérise par une faible pression partielle en  $O_2$  et les tissus hypoxiques ne sont donc pas suffisamment oxygénés (Shay and Celeste Simon, 2012). Un microenvironnement physiologiquement hypoxique a été observé dans divers tissus normaux, y compris la rétine, la zone médullaire du rein, l'épiderme de la peau, et des niches hypoxiques au sein de la moelle osseuse. De plus, l'hypoxie est une composante intégrale du microenvironnement tumoral (**figure 27**) (Semenza, 2012a).



**Figure 27: Section histologique de foyers hypoxiques dans le mélanome.** Cette image en immunofluorescence montre la distribution des zones hypoxiques marquées au pimonidazole (en vert) et des cellules endothéliales marquées (en rouge) avec CD31. D'après Noman et al.

En effet, lors de la formation d'une tumeur, les cellules tumorales prolifèrent plus rapidement que les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et certaines cellules se retrouvent alors éloignées du réseau sanguin (Zeng et al., 2015). Au-delà d'une distance de 110 µm, leur apport en oxygène et en nutriments devient insuffisant pour survivre et les cellules peuvent nécroser lorsque cette situation est chronique. C'est le cas de nombreux cancers qui présentent des zones de nécrose dans les régions déficientes en oxygène (Brahimi-Horn et al., 2007; Harris, 2002). Entre les vaisseaux sanguins et la zone nécrosée, il existe néanmoins une couche de cellules viables qui deviennent progressivement hypoxiques (**figure 28**). Le terme hypoxie fait plus spécifiquement référence à un taux d'oxygène plus faible que la normale, celle-ci étant de 21% (150 mmHg) dans l'air ambiant et de 2 à 9% (près de 40 mmHg) dans la majorité des tissus humains. L'hypoxie correspond donc à un taux d'oxygène inférieur à 2%, alors que l'anoxie (i.e. hypoxie sévère) correspond à un taux d'oxygène inférieur à 0,02% (Bertout et al., 2008). Même si l'hypoxie est toxique autant pour les

cellules saines que pour les cellules tumorales, ces dernières ont la capacité de s'y adapter de plusieurs façons et semblent même tirer avantage du MET hypoxique, *via* diverses interactions, favorisant leur croissance et leur dissémination (Serres et al., 2014). La première version du concept « Hallmarks of cancer » ne tenait pas compte de l'adaptation à un microenvironnement hypoxique (Hanahan and Weinberg, 2000). Dans leur version réactualisée, Hanahan et Weinberg ont ajouté l'implication de l'hypoxie dans le *switch* métabolique (Hanahan and Weinberg, 2011). Ainsi, la contribution du microenvironnement tumoral dans la progression du cancer, dont l'hypoxie, est de plus en plus étudiée.

Pour pallier au manque d'oxygène à l'intérieur d'une tumeur solide, des voies oncogéniques sont activées dans les cellules tumorales qui expriment alors des facteurs pro-angiogéniques pour induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Kerbel and Folkman, 2002). En fait, c'est la balance entre les signaux pro-angiogéniques et anti-angiogéniques (ou angiostatiques) qui détermine quand et comment l'angiogenèse surviendra. Ce switch angiogénique peut être déclenché par des signaux comme le stress métabolique (i.e. faible taux d'oxygène, pH acide, hypoglycémie) ou mécanique (i.e. pression exercée par les cellules proliférantes), par une réponse immunitaire (i.e. cellules immunitaires ayant infiltrées le tissu) ou par des mutations génétiques (i.e. activation d'oncogènes ou inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs) (Carmeliet and Jain, 2000). Les principaux facteurs angiogéniques exprimés en hypoxie sont le VEGF, les NOSs et le PDGF (figure 28) (Semenza, 1998). Toutefois, les vaisseaux sanguins tumoraux sont anormaux et forment des ramifications anormales, leur diamètre est irrégulier et la paroi endothéliale est plus fragile. Les cellules endothéliales qui composent ces néovaisseaux sanguins sont désorganisées et ne forment pas une monocouche normale (McDonald and Baluk, 2002). Leur rôle de barrière et leur fonctionnalité sont alors grandement affectés, réduisant ainsi la perfusion sanguine dans le tissu tumoral. L'oxygène et les nutriments disponibles sont donc plus rapidement épuisés par les cellules tumorales, ce qui mène à une baisse d'apport en oxygène et contribue ainsi au maintien d'un microenvironnement hypoxique (Semenza, 2011).

Finalement, il est important de noter que la réponse et l'adaptation des cellules à l'hypoxie sont contrôlées par différents facteurs de transcription. Parmi ces facteurs de transcription activés par une faible concentration d'oxygène se trouvent la protéine liant l'élément de réponse à l'AMP cyclique (CREB) (Beitner-Johnson and Millhorn, 1998), l'Activator Protein-1 (AP-1) (Bandyopadhyay et al., 1995), NF-κB (Koong et al., 1994), la protéine Egr-1 (Early Growth Response-1) (Nishi et al., 2002) et surtout le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) qui joue un rôle crucial dans la réponse cellulaire au stress hypoxique (Semenza and Wang, 1992).



**Figure 28: Influence de l'hypoxie sur l'angiogenèse tumorale.** À cause de l'organisation irrégulière de la vasculature tumorale, certaines cellules de la tumeur solide se situent à une distance supérieure à 110 μm d'un vaisseau sanguin (distance limite de diffusion de l'oxygène) et deviennent alors hypoxiques; le gradient de rouge à bleu indique la progression de l'hypoxie. Les cellules tumorales peuvent survivre à ces fluctuations d'oxygène en partie grâce à la sélection de clones ayant un phénotype pro-angiogénique. Les facteurs HIFs augmentent ainsi l'expression de plusieurs transcrits pro-angiogéniques (ex. VEGF, PDGFB et NOS). L'encadré à gauche illustre la relation entre la distance des cellules tumorales par rapport au vaisseau sanguin et leur degré d'hypoxie (ligne bleue) et d'acidose (ligne rouge). D'après (Carmeliet and Jain, 2000).

# 2. Les facteurs inductibles par l'hypoxie, HIFs

Le facteur de transcription HIF (Hypoxia inducible factor) est un hétérodimère constitué d'une sousunité  $\alpha$  sensible au taux d'O<sub>2</sub> (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , ou HIF-3 $\alpha$ ) et d'une sous-unité  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ /Récepteur d'hydrocarbure aryle translocateur nucléaire (ARNT)), exprimée de manière constitutive. HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont structurellement similaires au niveau de leurs domaines de dimérisation et de liaison à l'ADN mais se diffèrencient au niveau de leurs domaines de transactivation. Par conséquent, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  partagent des gènes cibles communs, mais chacun régule également un ensemble de gènes cibles uniques.

Les gènes induits par l'hypoxie jouent des rôles importants dans la régulation de différents paramètres biologiques de la tumeur, tels que l'angiogenèse, la survie cellulaire, la chimio-et radio-résistance, la prolifération, l'invasion et les métastases, la régulation du pH et le métabolisme, la résistance au système immunitaire, et le maintien de CSC (Semenza, 2012b). Finalement, la surexpression de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  a été observée dans plusieurs types de cancers et la sous-unité HIF-2 $\alpha$  est également surexprimée par les TAMs (Talks et al., 2000). HIF-3 $\alpha$  est quant à elle moins étudiée que les deux autres sous-unités alpha et elle est présente dans peu de tissus (Rohwer and Cramer, 2011).

### • Le facteur de transcription HIF-1

HIF-1 est le régulateur le plus important dans le contrôle de l'homéostasie de l'oxygène. HIF-1, en induisant une batterie de gènes cibles, permet la réponse et l'adaptation des cellules dans un microenvironnement pauvre en oxygène. Ce facteur de transcription a été identifié pour la première fois en 1992 par Gregg Semenza comme régulateur crucial de l'expression du gène de l'érythropoïétine (EPO) en réponse à une faible concentration en oxygène (Semenza and Wang, 1992). A l'heure actuelle, plus d'une centaine de gènes ont été identifiés comme cibles de HIF-1. Ces gènes permettant la réponse et l'adaptation des cellules à l'hypoxie, sont impliqués dans les phénomènes d'angiogenèse, de glycolyse, de prolifération et survie, de régulation du pH, d'autophagie, d'invasion et de migration (Semenza, 2003) (**figure 29**).



Figure 29: Les différents gènes régulés par HIF-1 $\alpha$ . Les cellules réagissent à l'hypoxie en activant les facteurs de transcription HIF, modulant ainsi les gènes cibles clés afin de permettre la survie et rétablir une alimentation normale en oxygène. Dans les tumeurs, une signalisation HIF déséquilibrée peut contribuer à la progression tumorale. D'après (Bedogni and Powell, 2009).

HIF-1 appartient à une classe de facteur de transcription de la famille des protéines basic helixloop-helix (bHLH)/Per-ARNT-Sim (PAS) et reconnaît des séquences spécifiques sur l'ADN (5'-RCGTG-3') appelées élément de réponse à l'hypoxie (ou Hypoxia-Response Element (HRE)) (Wang et al., 1995). Le complexe HIF-1, une fois lié à l'ADN, peut recruter un certain nombre de co-activateurs, tels que p300/CBP, Ref-1, Jab1, SCR-1 et TIF2, facilitant ainsi l'expression des gènes cibles (Wenger, 2002). La synthèse de HIF-1 $\alpha$  est induite par un mécanisme indépendant de l'oxygène, alors que sa dégradation est régulée par un mécanisme dépendant de l'oxygène (Semenza, 2003). La demi-vie de la protéine HIF-1 $\alpha$  est estimée à moins de cinq minutes, ce qui en fait une des protéines les plus rapidement dégradées (Huang et al., 1996). En conditions normoxiques, les sous-unités alpha sont ciblées par les PHDs (oxygen-sensitive prolyl-hydroxylases) et le suppresseur de tumeur VHL pour être ubiquitinées, puis dégradées par la machinerie du protéasome. En présence d'oxygène, le facteur HIF1AN (hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit inhibitor) mène lui aussi à l'inactivation des HIFs par hydroxylation. Toutefois, en conditions hypoxiques, les protéines HIF-1 $\alpha$  sont stabilisées, les proteines HIFs peuvent former un hétérodimère puis se lier à des régions spécifiques du promoteur de ses gènes cibles pour induire leur expression (Semenza, 2010) (**figure 30**).



**Figure 30:** Régulation de HIF-1*a* par hydroxylation des résidus proline. a. En normoxie, HIF-1*a* est hydroxylé par les proline hydroxylases (PHD1, -2 et -3) en présence de Fe<sup>2+</sup>, de 2-oxoglutarate (2-OG) et d'ascorbate. Une fois hydroxylée, la protéine HIF-1*a* est reconnue par la protéine VHL faisant partie d'un complexe ubiquitine ligase qui ajoute des ubiquitines afin que la protéine soit reconnue et dégradée par le protéasome. **b**. En hypoxie, l'hydroxylation des résidus proline de HIF-1*a* est inhibée. Le facteur VHL n'est alors plus capable de se lier à HIF-1*a* et la dégradation de celle-ci est inhibée, entrainant une accumulation et une translocation de HIF-1*a* vers le noyau. La sous-unité alpha peut alors se dimériser avec la sous-unité bêta et se lier aux motifs HREs au niveau du promoteur de gènes cibles et y recruter des co-activateurs de la transcription tels que p300 et CBP (CREB-binding protein). D'après (Carroll and Ashcroft, 2005).

# 3. Hypoxie et cancer

L'hypoxie tumorale est un facteur de mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers (Harris, 2002). En effet, des analyses immunohistochimiques ont permis d'établir que la surexpression des

principaux médiateurs de l'hypoxie, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , est associée à une diminution du taux de survie chez les patients dans un large éventail de tumeurs malignes chez l'humain (Semenza, 2010). L'accumulation de HIF-1 $\alpha$  est ainsi associée à un faible taux de survie dans les cancers du col de l'utérus, du sein, des ovaires et de l'endomètre, ainsi que l'oligodendrogliome et le carcinome squameux oropharyngé. Pour ce qui est de HIF-2 $\alpha$ , sa surexpression a été associée à une augmentation du taux de mortalité dans d'autres types de cancers comme le cancer du poumon non à petites cellules, le neuroblastome, l'astrocytome et le carcinome squameux de la tête et du cou (Bertout et al., 2008; Semenza, 2010).

L'hypoxie tumorale est également un facteur de résistance aux thérapeutiques anti-cancéreuses comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. Ainsi, de nombreuses tumeurs traitées par radiothérapie ont un contrôle local significativement diminué lorsque leur pression partielle d'oxygène, pO<sub>2</sub>, est réduite. En effet, pour certains cancers comme les cancers gynécologiques, des voies aéro-digestives supérieures ou des tumeurs cérébrales, la radiothérapie est souvent la base du traitement. Toutefois, certaines de ces tumeurs, en particulier les glioblastomes, qui sont des tumeurs cérébrales extrêmement agressives, sont des tumeurs très hypoxiques qui récidivent dans les champs d'irradiation malgré un traitement bien conduit associant chirurgie et radiothérapie (Brat and Mapstone, 2003; Kaur et al., 2005) ou associant la radiothérapie et la chimiothérapie à visée radiosensibilisante (Stupp et al., 2005). Dans les études précliniques, l'inhibition de l'activité de HIF-1 a montré des effets remarquables sur la croissance tumorale. Des études visent donc à identifier des inhibiteurs de HIF-1 et à tester leur efficacité en tant qu'agents thérapeutiques anticancéreux (Semenza, 2003). Ces dernières années, de nombreux travaux de recherche se sont d'autre part intéressés à l'étude des mécanismes régulant l'hypoxie tumorale, ceci dans le but de mettre à jour de nouvelles cibles susceptibles de réduire cette hypoxie tumorale, ré-oxygéner les tumeurs et ainsi augmenter l'efficacité des thérapeutiques anticancéreuses.

# 4. Hypoxie et mélanome

L'hypoxie joue aussi un rôle dans le développement du mélanome cutané. La perte de l'expression du gène *MITF* (microphthalmia transcription factor) en hypoxie, qui est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation du mélanocyte, représente un évènement important dans la progression du mélanome cutané vers le stade métastatique (Cheli et al., 2012). En effet, l'hypoxie favorise l'apparition de cellules tumorales avec un phénotype indifférencié plus invasif (Chang et al., 2008).

# 5. Effet du stress hypoxique sur la réponse immune antitumorale

Le stress hypoxique joue clairement un rôle crucial dans l'échappement immunitaire des cellules tumorales par différents mécanismes en favorisant une immunosuppression locale et en inhibant les fonctions des cellules immunitaires effectrices en les rendant anergiques (Hasmim et al., 2015). Cidessous, je détaillerai l'effet du stress hypoxique sur les effecteurs cytotoxiques et sur les cellules immunosupressives notamment les cellules myéloïdes suppressives et les macrophages associés aux tumeurs.

# 5.1. Effet de l'hypoxie sur les effecteurs cytotoxiques

Balsamo et ses collègues ont montré que les cellules NK s'adaptent au stress hypoxique en augmentant l'expression de HIF-1a. Ces travaux ont démontré que sous hypoxie, les cellules NK perdent leur capacité à augmenter l'expression de surface des récepteurs activateurs NKp46. NKp30, NKp44 et NKG2D en réponse à l'IL-2 ou à d'autres cytokines activatrices (IL-12, IL-15 et IL-21). Ces caractéristiques phénotypiques altérées sont corrélées à des réponses réduites aux signaux d'activation, ce qui entraîne une diminution de la susceptibilité des cellules cibles tumorales à la lyse médiée par les NK (Balsamo et al., 2013). L'accumulation des données expérimentales et cliniques indique également que plusieurs mécanismes de suppression des fonctions immunitaires sont induits dans le MET. Une plus grande attention a été récemment portée sur les mécanismes par lesquels le stress hypoxique au niveau du microenvironnement tumoral altère la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse médiée par les cellules immunitaires. Il a été montré dans notre équipe que l'exposition des cellules tumorales à l'hypoxie inhibe la lyse spécifique induite par les CTL par un mécanisme impliquant une translocation nucléaire de HIF-1a, la phosphorylation de STAT3 et la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales (Noman et al., 2009). Le « silencing » de STAT3 abouti ainsi à l'inhibition de HIF-1α et à une restauration significative de la sensibilité de la cellule cible à la destruction induite par les CTL dans des conditions hypoxiques par un mécanisme impliquant, du moins en partie, la régulation négative de la phosphorylation de AKT. De plus, il a été montré récemment que l'autophagie médiée par l'hypoxie au niveau des cellules tumorales induit une résistance aux CTL (Noman et al., 2011a). Une autre étude dans le laboratoire a également montré que le miR-210 régulé par l'hypoxie dans le cancer du poumon et le mélanome, diminue la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse médiée par les CTL (Noman et al., 2012). De plus et de manière intéressante, il a été montré que l'hypoxie pouvait altérer la sensibilité des cellules du cancer du sein à la lyse médiée par NK in vitro par l'activation de l'autophagie. Cette déficience n'est pas liée à un défaut de reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK mais à la dégradation du granzyme B sécrété par les cellules NK dans des autophagosomes présents au niveau des cellules tumorales hypoxiques. L'inhibition de l'autophagie en ciblant beclin1 (BECN1) entraine ainsi la restauration des taux de granzyme B dans des cellules hypoxiques *in vitro* et induit une régression tumorale *in vivo* en facilitant la destruction des cellules tumorales induite par les cellules NK (Baginska et al., 2013).

# 5.2. Effet de l'hypoxie sur les cellules myéloïdes suppressives

L'hypoxie oriente les cellules myéloïdes vers un phénotype immunosuppresseur. Les zones hypoxiques au niveau des tumeurs solides sont infiltrées par un grand nombre de cellules immunosuppressives, telles que les MDSCs (Noman et al., 2011b). Récemment, notre équipe a montré que l'expression de PD-L1 par les MDSCs en hypoxie augmente la tolérance des lymphocytes T. L'expression de PD-L1 est plus forte à la surface des MDSCs infiltrant la tumeur que des MDSCs spléniques, et il a été montré que l'hypoxie pouvait augmenter de manière importante le taux d'expression de PD-L1 à la surface des MDSCs isolées à partir de la rate dans différentes tumeurs murines (Noman et al., 2014). De plus, il semble que HIF-1 $\alpha$  soit un régulateur majeur de l'expression de l'ARNm et de la protéine PD-L1 en se liant directement à l'élément de réponse à l'hypoxie présent au niveau du promoteur proximal de PD-L1 (Barsoum et al., 2014). Finalement, ces travaux ont montré que les fonctions immunosuppressives amplifiées des MDSCs en conditions hypoxiques (augmentation de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-10), peuvent être abrogées après blocage de PD-L1 (Noman and Chouaib, 2014; Noman et al., 2014).

# 5.3. Effet de l'hypoxie sur les macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages constituent une composante principale de l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs solides (comme détaillé précédemment) (Corzo et al., 2010). Les TAMs sont préférentiellement situés au niveau des zones hypoxiques de la tumeur et des zones où s'accumulent HIF-1 et HIF-2 (Chaturvedi et al., 2014; Lewis et al., 2000). La contribution de HIF-1 et HIF-2 dans la régulation de l'expression génique au niveau des TAMs n'est pas tout à fait claire. Cependant, des études rapportent le rôle de HIF-1 et HIF-2 dans la promotion des propriétés angiogéniques des macrophages (Werno et al., 2010). HIF-1 $\alpha$  a été aussi rapporté comme étant crucial pour l'inhibition des fonctions des cellules T médiée par les macrophages dans des conditions hypoxiques (Doedens et al., 2010). De plus, dans les zones hypoxiques de tumeurs, les TAMs régulent aussi l'expression de MMP7 (Burke et al., 2003). MMP7 est connue pour cliver FasL à la surface des cellules NK et les lymphocytes T (Fingleton et al., 2001).

# 6. Les approches thérapeutiques

Contrecarrer le microenvironnement hypoxique et les facteurs inductibles par l'hypoxie est sans doute l'une des approches thérapeutiques antitumorales les plus attrayantes (Wigerup et al., 2016). Plusieurs approches pour cibler les cellules tumorales hypoxiques ont été proposées, y compris la thérapie génique, les bactéries anaérobies recombinantes, les promédicaments activés par l'hypoxie, le ciblage spécifique de HIF ou le ciblage des voies importantes dans les cellules hypoxiques telles que les voies mTOR et UPR (Melillo, 2007; Wilson and Hay, 2011).

# • Les promédicaments activés par l'hypoxie

Un promédicament est un composé inactif qui peut être converti en substances pharmacologiquement actives soit spontanément ou *via* des voies métaboliques spécifiques. Une façon d'exploiter l'hypoxie tumorale a été de concevoir des promédicaments qui sont activés dans des tissus hypoxiques et vont sélectivement tuer les cellules tumorales dans ces zones. Plusieurs promédicaments sont ainsi en essais précliniques et cliniques (Denny, 2000).

# • Les médicaments ciblant les voies de signalisation induites par l'hypoxie

Les stratégies pour agir sur le microenvironnement hypoxique incluent le ciblage direct de HIF notamment en bloquant son expression par l'utilisation d'inhibiteurs de la topoisomérase I (ex. topotécan) (Rapisarda et al., 2002), en diminuant son expression par des drogues (ex. digoxin) (Zhang et al., 2008) ou en induisant sa dégradation par des mécanismes indépendants de VHL (ex. inhibiteurs de HSP90) (Isaacs et al., 2002). De plus l'activité de HIF peut être bloquée par des molécules inhibitrices (ex. YC-1) (Chun et al., 2001) ainsi qu'en utilisant des inhibiteurs de la dimérisation de HIF- $\alpha$  et HIF- $\beta$  (ex. acriflavine) (Lee et al., 2009). Le ciblage indirect de HIF est également possible par le ciblage des voies de signalisation en aval de HIF. Ainsi les thérapies anti-VEGF grâce à des anticorps monoclonaux ciblant le VEGF (bevacizumab) ou grâce à des molécules inhibitrices ciblant le récepteur du VEGF ont montré un avantage clinique dans les cancers avancés. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs non sélectifs qui ciblent plusieurs voies, y compris les voies de HIF, pourrait constituer une thérapie anti-tumorale intéressante (Ellis and Hicklin, 2008).

# Objectifs des travaux

# **OBJECTIFS DES TRAVAUX**

Comme décrit dans l'introduction, les fibroblastes associés aux cancers sont particulièrement relevants en ce qui concerne l'interaction cellules tumorales-stroma et par conséquent jouent un rôle majeur dans la progression tumorale en sécrétant divers facteurs. Il a notamment été démontré que les CAFs augmentent l'angiogenèse tumorale et favorisent l'invasion et les processus métastasiques. Au cours des dernières années, les CAFs ont également été impliqués dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale, en particulier par la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs dans le microenvironnement tumoral. Ces CAFs peuvent ainsi potentiellement affecter à la fois la réponse immune anti-tumorale innée et adaptative de manière directe et indirecte dans le microenvironnement tumoral en augmentant par exemple le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) ou en augmentant le nombre de lymphocytes T régulateurs au sein de la tumeur ainsi qu'en diminuant le potentiel lytique des effecteurs cytotoxiques anti-tumoraux NK. De ce fait, les CAFs agissent globalement sur les différentes composantes de la réponse immune anti-tumorale. Néanmoins, l'influence de ces CAFs sur la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse médiée par ces mêmes effecteurs n'a jamais été étudiée. Dans un modèle de mélanome, mon premier objectif de thèse a donc été de déterminer si les CAFs influencent négativement la lyse des cellules tumorales par les effecteurs cytotoxiques, et d'identifier les mécanismes y étant associés. La stratégie adoptée a été d'isoler des CAFs grâce à des biopsies de mélanome et de générer des milieux conditionnés à partir des cultures primaires de ces cellules, qui ont été ensuite utlisés pour traiter des cellules tumorales de mélanome avant de tester leur sensibilité à la lyse induite par les cellules NK.

De plus, je me suis intéressée à une autre composante majeure du microenvironnement tumoral qui est l'hypoxie. En effet, comme mentionné dans l'introduction, les tumeurs solides sont souvent caractérisées par leur vascularisation très hétérogène, et contiennent donc de larges régions ayant une faible pression partielle en oxygène. L'hypoxie influence ainsi plusieurs paramètres biologiques pouvant modifier le potentiel malin de la tumeur et sa résistance aux thérapies anti-tumorales. Au niveau cellulaire, l'hypoxie par l'intermédiaire de voies de réponses spécifiques, comme celle des protéines de la famille HIF, induit l'activation de plusieurs voies de signalisation, régulant de nombreux processus cellulaires tels que l'angiogenèse, le métabolisme, la prolifération cellulaire ou l'apoptose. L'hypoxie joue également un rôle dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale notamment au niveau des macrophages, cellules myéloïdes immunosuppressives, cellules Treg et des «immune checkpoints». Néanmoins, l'effet de l'hypoxie sur les capacités immunosuppressives des CAFs n'avait également pas encore été documenté. Compte tenu de ces

données, mon second objectif de thèse a été de déterminer l'effet du dialogue entre hypoxie et CAFs sur les capacités immuno-modulatrices de ces derniers. La stratégie adoptée a été à nouveau d'isoler des CAFs grâce à des biopsies de mélanome puis de les placer en conditions hypoxiques avant d'analyser leur profil transcriptomique et de focaliser l'analyse bio-informatique sur les gènes sur-exprimés possédant une activité immuno-modulatrice potentielle.

# Résultats
I. Mise en évidence de l'effet délétère des fibroblastes associés au mélanome et de leur sécrétion de métalloprotéinases matricielles sur la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse par les effecteurs cytotoxiques NK

Article: Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK cell-mediated killing through matrix-metalloproteinases secretion

Ziani L, Ben Safta-Saadoun T, Gourbeix J, Cavalcanti A, Robert C, Favre G, Chouaib S, Thiery J

Oncotarget (2017) DOI: 10.18632/oncotarget.15540

#### RESUME

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'influence des fibroblastes associés au cancer sur la modulation de la susceptibilité des cellules tumorales à la lyse médiée par les effecteurs cytotoxiques (en particulier les cellules NK) et à l'identification des mécanismes associés à cette modulation de la cytotoxicité.

Pour ce travail, nous avons choisi comme modèle d'étude le mélanome. Grâce à des biopsies tumorales de patients atteints de mélanome, nous avons généré des cultures primaires de CAFs à partir desquelles nous avons obtenu des milieux conditionnés que nous avons utilisé pour étudier l'influence du sécrétome des CAFs sur la susceptibilité des cellules tumorales de mélaonome à la lyse induite par les cellules NK. De manière intéressante, nos résultats ont montré que les fibroblastes associés au mélanome diminuent la sensibilité des cellules tumorales de mélanome à la lyse induite par les NK par une sécrétion élevée de métalloprotéinases matricielles actives que nous avons mesuré par une approche de FRET dans les milieux conditionnés. De plus, nous avons montré que cette sécrétion de MMPs réduit l'expression par « shedding » de deux ligands du récepteur activateur NKG2D, à savoir MICA/B, à la surface des cellules tumorales et diminue par conséquent l'activité cytotoxique des cellules NK dépendante de NKG2D. De plus, cette réduction de l'activation des cellules NK face à leurs cellules tumorales cibles se traduit également par un défaut de production d'IFN-γ.

Nos données démontrent donc que les CAFs peuvent altérer la susceptibilité des cellules tumorales de mélanome aux cellules tueuses, et que ces CAFs sont donc un déterminant important de l'altération de la réponse immunitaire antitumorale.

# Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK cell-mediated killing through matrix-metalloproteinases secretion

Linda Ziani<sup>1,2,3</sup>, Thouraya Ben Safta-Saadoun<sup>1,2,3</sup>, Johanne Gourbeix<sup>1,2</sup>, Andrea Cavalcanti<sup>4</sup>, Caroline Robert<sup>2,3,5,6</sup>, Gilles Favre<sup>7</sup>, Salem Chouaib<sup>1,2,3</sup>, Jerome Thiery<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR 1186, Villejuif, France

<sup>2</sup>Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

<sup>3</sup>University Paris Sud, Faculty of Medicine, Le Kremlin Bicêtre, France

<sup>4</sup>Department of General Surgery, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

<sup>5</sup>INSERM, UMR 981, Villejuif, France

<sup>6</sup>Dermatology Service, Department of Medicine, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

<sup>7</sup>INSERM, UMR 1037, Toulouse, France

Correspondence to: Jerome Thiery, email: jerome.thiery@gustaveroussy.fr

Keywords: cancer-associated fibroblasts, natural killer cells, matrix-metalloproteinases, MICA/B, melanomaReceived: October 11, 2016Accepted: January 16, 2017Published: February 20, 2017

ABSTRACT

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) play a central role in the complex process of tumor-stroma interaction and promote tumor growth. Emerging evidences also suggest that these fibroblasts are involved in the alteration of the anti-tumor immune response by impacting several immune cell populations, especially through their secretion of pro-inflammatory and immunosuppressive factors in the tumor microenvironment. However, the underlying immuno-modulating mechanisms triggered by these fibroblasts are still only partially defined. In this study, we provide evidence that melanoma-associated fibroblasts decrease the susceptibility of melanoma tumor cells to NK-mediated lysis through the secretion of active matrix metalloproteinases. This secretion reduces the expression of the two NKG2D ligands, MICA/B, at the surface of tumor cells and consequently decreases the NKG2D-dependent cytotoxic activity of NK cells against melanoma tumor cells. Together, our data demonstrate that the modification of tumor cell susceptibility to killer cells is an important determinant of the anti-tumor immune response alteration triggered by CAFs.

#### **INTRODUCTION**

Over the past decade, the tumor microenvironment has gained much attention as a critical determinant of tumor progression and clinical outcome [1–3]. Among the stromal cells, activated fibroblasts that share similarities with fibroblasts stimulated by inflammatory signals or activated during a wound healing process, termed cancer-associated fibroblasts (CAFs), play a critical role in the complex process of tumor-stroma interaction [4, 5]. CAFs, one of the prominent stromal cell population in most types of human carcinomas, are  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth muscle actin) positive, spindle-shaped cells, who differentiate and proliferate in the tumor microenvironment in a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF)-dependent manner from other cell types such as resident fibroblasts, mesenchymal stem cells, endothelial and epithelial cells [5–9]

In the tumor stroma, CAFs play an important role by directly interacting with tumor cells and by the secretion of extracellular matrix proteins (i.e. collagen), matrix metalloproteinases (MMPs), proteoglycans (i.e. laminin), chemokines (i.e. CXCL12/SDF1), vascularisation promoting proteins (i.e. VEGF) and other factors which affect tumor cells proliferation, invasiveness, survival and stemness (i.e. TGF- $\beta$ ) [5, 10–15]. Consequently, CAFs are a key determinant in tumor growth, angiogenesis, cancer stemness, extracellular matrix remodeling, tissue invasion, metastasis and even chemoresistance [5, 16–18].

During the past few years, it has also been either directly demonstrated or suggested that these activated tumor-associated fibroblasts can affect both the innate and the adaptive antitumor immune response, especially by the secretion of pro-inflammatory and immunosuppressive factors in the tumor microenvironment [19, 20]. In this regard, the secretion of TGF- $\beta$  by CAFs potentially affects several immune cell populations [21], including dendritic cells (by inhibiting their migration, maturation and antigen presentation capabilities [22]), regulatory T cells (Tregs) (by increasing their number within the tumor microenvironment through the induction of FOXP3 expression [23]), cytotoxic T lymphocytes (CTL) (by interfering with their function and frequency within the tumor [24, 25]) and natural killer (NK) cells (by attenuating their interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production and their expression of NK-activating receptors including NKG2D, NKp30 and NKp44 [26-28]). Similarly, CAFs are a source of VEGF, which is known to affect dendritic cell function, to inhibit the migration of CTL to the tumor and to increase the infiltration of Tregs and immunosuppressive myeloid-derived suppressive cells (MDSC) within the tumor [29]. Moreover, the secretion of several chemokines by CAFs (including CXCL12/SDF1 and CCL2/MCP-1) can potentially attract macrophages in the tumor microenvironment and induce their differentiation into an M2 immunosuppressive phenotype [30, 31], and also allow the recruitment of immunosuppressive MDSC populations in the stroma [32, 33]. Finally, studies involving melanoma, hepatocellular and colorectal carcinoma-derived fibroblasts have shown that CAFs can decrease the expression of several NK activating receptors (including NKp30, NKp44 and NKG2D) on the NK cell surface through the secretion of prostaglandin E2 (PGE2) and/or indoleamine-2,3dioxygenase (IDO) [34-36] leading to an attenuate cytotoxic activity of NK cells against their tumor target cells.

These findings highlight the action of CAFs on various immune cell populations involved in the antitumor immune response. However, direct evidence supporting that CAFs also interfere with the tumor cell susceptibility to CTL or NK cell-mediated lysis is still lacking. In this study, we found that melanoma-associated fibroblasts decrease the susceptibility of melanoma tumor cells to NK-mediated lysis through the secretion of high levels of active MMPs, which reduce the NKG2Ddependent cytotoxic activity of NK cells by inducing the shedding of two NKG2D ligands, MICA/B, at the surface of tumor cells.

# RESULTS

#### Phenotypic characterization of human fibroblasts isolated from melanoma and normal skin

In order to study the role of melanoma-associated fibroblasts on the modulation of melanoma tumor cell susceptibility to NK cell-mediated lysis, we established four CAFs and three normal skin fibroblasts (NF) primary cell populations from melanoma patient's tumor resection and from normal skin (Table 1). The adherent cells, which display a fibroblast-like morphology (i.e. elongated cells with cytoplasmic extensions) (Figure 1A) were further characterized by flow cytometry and fluorescence microscopy. Both melanoma and normal skin-derived cell populations express the fibroblastic marker FSP-1 (Fibroblast Specific Protein-1) and the mesenchymal marker vimentin, but not the epithelial marker E-cadherin, the endothelial marker CD31, the hematopoietic marker CD34 or the leukocyte marker CD45 (Figure 1B). Moreover, the melanoma-derived fibroblasts (CAF1-4) exhibit an activated phenotype as shown by a higher  $\alpha$ -SMA expression compared to the fibroblasts derived from normal skin (NF1-3) (Figure 1C-1D). These observations indicate that these cell populations are mainly fibroblasts, with minimal contamination with epithelial, endothelial or hematopoietic cells, and confirm the previously described different activation level between tumor-derived and normal fibroblasts.

## Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK-mediated lysis

The pro-tumorigenic activity of CAFs includes direct cellular interactions and mostly paracrine effects affecting different cell types present in the tumor microenvironment. To investigate the effect of melanomaderived CAFs on melanoma tumor cell susceptibility to NK cell-dependent killing, focusing on their "secretome", we generated conditioned medium (CM) from the culture supernatants of melanoma-derived fibroblasts (CAF1-4) and normal skin-derived fibroblasts (NF1-3) and used them to treat a melanoma tumor cell line establish from a tumor biopsy (T1) during 48 hrs. The lysis of T1 target cells by the NK92 clone was thus strongly decreased after pre-treatment with the CAF1-4 CMs while NF1-3 CMs have no effect (Figure 2A-2C). To confirm these results, we used NK cells isolated from two different healthy donor's peripheral blood (NKd1 and NKd2) to test their lytic potential against the T1 melanoma target cells pretreated with the CAF1,3,4 and NF2,3 CMs. As expected, the NKd1 or NKd2-mediated lysis of T1 target cells was also strongly decreased after pre-treatment with the CAF1-4 CMs while NF2-3 CMs have no effect (Figure 2D-2F).

Primary fibroblast culture	Origin	Stade
NF1	Normal skin	-
NF2	Normal skin	-
NF3	Normal skin	-
CAF1	Melanoma	Metastatic
CAF2	Melanoma	Metastatic
CAF3	Melanoma	Metastatic
CAF4	Melanoma	Primitive

## Table 1: List of the different fibroblast populations

NF: normal fibroblast. CAF: cancer-associated fibroblast.



**Figure 1: Phenotypes of fibroblasts derived from melanoma and normal skin.** (A) Morphology of the different fibroblastic primary cultures by phase contrast microscopy. (B) Expression of the fibroblastic, mesenchymal epithelial, endothelial, hematopoietic or leukocytic markers FSP-1, Vimentin, E-cadherin, CD31, CD34 or CD45 by the different isolated fibroblast populations. Data are expressed as the percentage of positive cells ± s.d. from three independent flow cytometry experiments. (C–D) CAFs isolated from melanoma patient's tumor biopsies display an activated phenotype. The expression of the activation marker  $\alpha$ -SMA, together with the mesenchymal marker Vimentin, was evaluated by fluorescence microscopy (C) and western blot (D). CAFs express more  $\alpha$ -SMA than normal skin fibroblasts. The  $\alpha$ -SMA/Vimentin ratio from (D) was calculated by densitometry and normalized to "1" in NF1 cells (A.U.: arbitrary units). Data (C–D) are representative of three independent experiments. Scale bars (A, C): 50 µm

Similar results were also obtained using the melanoma tumor cell line WM17-16 and NKd1 effector cells (Supplementary Figure 1).

We then tested whether CAF CMs affect NK cells adhesion to T1 target cells by measuring the immune conjugate formation between T1 cells and NK92 effector cells. CAF or NF CMs-pretreated (48 hrs) or control T1 target cells and NK92 were respectively stained with the lypophilic dyes DiO or DiD and conjugates formation was measured by flow cytometry after 30 min of co-culture. No significant differences were observed for the formation of immune conjugates between NK92 cells and T1 control cells or T1 target cells pretreated with either the CAFs or the NFs CMs (Supplementary Figure 2A–2B). To further confirm these results, we also evaluated ICAM-1/CD54 expression at the surface of T1 targets cells, since its interaction with LFA-1 contributes to NK cells adhesion to targets cells. Consistently with the lack of difference in the formation of immune conjugates between NK92 cells and T1 control cells or T1 target cells pretreated with either the CAFs or the NFs CMs, ICAM-1 surface expression was similar in either control or CMs-treated T1 cells (Supplementary Figure 2C). Because the lysis of the T1 tumor target cells by the NK92 clone and by NK cells isolated from healthy donor's is mainly mediated by the Perforin/Granzymes (PFN/Gzms) pathway, as shown by abrogation of NK92 and NKds cytotoxicity after treatment with concanamycin A (CMA) which inhibits cytotoxic



**Figure 2: Conditioned media from melanoma-associated fibroblasts decrease the susceptibility of tumor cells to NK-mediated killing.** (A–C) The lysis of the T1 melanoma cell line, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) (A) or normal skin fibroblasts (NF1-3) (B) by the NK92 clone was evaluated by <sup>51</sup>Cr release assays at different effector:target (E:T) ratios. Data are the mean  $\pm$  s.d. from five independent experiments. Experiments in (A–B) were performed at the same time but separated in two different panels. (C) represents the mean  $\pm$  s.d. of all the NK92-mediated lysis experiments from (A–B) using the CAFs or NFs pre-treatments of the T1 tumor cell line. (D–E) The lysis of the T1 melanoma cell line, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1, 3 or 4) or normal skin fibroblasts (NF2-3) by the NK cells isolated from two healthy donors (NKd1 and NKd2) was evaluated by <sup>51</sup>Cr release assays at different effector:target (E:T) ratios (D–E). Data are the mean  $\pm$  s.d. of all the NKd-mediated lysis experiments from (D–E) using the CAFs or NFs pre-treatments of the T1 tumor cell line. *P* values (C–D) were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test comparing the control and CAFs CM pre-treatments. (\*p < 0.05; \*\*p < 0.001)

granules exocytosis (Supplementary Figure 3A), we also tested whether the CAFs or the NFs CMs alter T1 tumor cell susceptibility to PFN/Granzyme B (GzmB)-induced cell death by measuring the activation of effector caspases in either control or CMs-pre-treated cells. We used a flow cytometry-based assay using M30-FITC mAbs to detect a caspase-3 cleavage product of cytokeratin 18 (CK18) [37, 38]. Again, no significant differences were observed for PFN/GzmB-induced apoptosis between T1 control cells or T1 cells pre-treated with either the CAFs or the NFs CMs (Supplementary Figure 3B). Together, these results indicate that melanoma-associated fibroblasts protect melanoma tumor cells against NK-mediated cytotoxicity by a mechanism which is not associated with an alteration of tumor cell recognition or with a decrease of tumor cell susceptibility to PFN/GzmB-induced cell death.

# Melanoma-associated fibroblasts decrease MICA/B expression on tumor cells

NK cell functions are regulated by a balance of activating and inhibiting signals triggered by membrane receptors expressed by NK cells and their corresponding ligands expressed by target cells [39]. Among these receptors, the activating receptor NKG2D/CD314 is of major importance for NK cell activation and cytotoxic or secretory functions [40]. NKG2D (Natural Killer Group 2 member D) recognizes ligands from the MIC (MHC class I chain-related protein) and ULBP (HCMV UL16-binding proteins) families which appear on the surface of stressed, transformed or infected target cells. In humans, there are currently eight known members of the MIC and ULBP families: MICA, MICB and ULBP 1-6 [40]. In order to determine whether an alteration of the NKG2D/NKG2D ligands activating pathway might be involved in the decreased susceptibility of melanoma tumor cells to NK-mediated lysis following CAFs CMs treatment, we first determined whether this pathway is involved in NK-mediated killing of the T1 cell line. All NK effector cells used in this study (NK92, NKd1 and NKd2) expressed the NKG2D receptor (Supplementary Figure 4A). Moreover, the use of an anti-NKG2D blocking mAb strongly decreased NK92-, NKd1- and NKd2-mediated killing of T1 melanoma cells (Supplementary Figure 4B), demonstrating that NKG2D is an important determinant for the lysis of T1 cells by NK cells. We then tested the NKG2D ligands expression at the surface of T1 melanoma cells and investigated whether the pre-treatment of these cells with CAFs or NFs CMs can alter their membrane expression. T1 cells strongly express MICA/B and ULBP2/5/6, very slightly express ULBP1 and are negative for ULBP3 and ULBP4 (Figure 3). Importantly, the pretreatment of T1 cells with the CAFs or NFs CMs does not modify ULBPs surface expression (Figure 3A, 3C), but the pre-treatment of T1 cells with the CAFs CMs strongly decreases MICA/B membrane expression, while the NFs CMs have no effect (Figure 3A–3B). Furthermore, we evaluated by ELISA the presence of soluble MICA (sMICA) or MICB (sMICB) in tumor cell supernatants following treatment with the CAFs CMs. The concentration of both sMICA and sMICB were thus significantly increased in the supernatant of T1 melanoma tumor cells after treatment with the CAF1-4 CMs compared to control cells (Figure 3D). Together, these results suggest that melanoma-associated fibroblasts protect melanoma tumor cells against NK-mediated cytotoxicity by the secretion of soluble factors leading to a decrease of MICA/B expression at the surface of tumor cells, most likely by a mechanism which involved MICA and MICB shedding at the melanoma tumor cell surface.

## The secretion of high levels of active matrix metalloproteinases by melanoma-associated fibroblasts is associated with the decrease of MICA/B expression on tumor cells

Although NKG2D ligands, including MICA and MICB, are up-regulated during malignant transformation in response to oncogenic activation, their expression can be down-regulated both transcriptionally and nontranscriptionally at the level of tumor cells to escape antitumor the immune response [41]. For example, the secretion of TGF-B or IFN-y down-regulates NKG2D ligands transcription in tumor cell lines [42-44]. In addition, several studies have reported that the secretion or expression of MMPs by tumor cells (including the secreted MMP-2, MMP-9 and the membrane type MMP-14) can lead to the shedding of MICA/B at their surface [45-51]. MMPs belong to a group of 26 human zinc-binding endopeptidases which are secreted or anchored to the cell membrane and involved in the degradation of different components of the extracellular matrix [52]. As such MMPs play an important role in tumor cell migration and invasion [53]. Importantly, CAFs also play an important role in the modification of the extracellular matrix by expressing a large variety of matrix remodeling enzymes such as MMPs [16]. We thus hypothesized that high levels of active MMPs secreted by our melanoma-associated fibroblasts could induce the observed decrease of MICA/B and shedding at the surface of the T1 melanoma tumor cells. To validate this hypothesis, we first evaluate MMPs activity in the CAFs and NFs CMs. We used a fluorescence-based assay to measure the activity of MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, and 14. This assay is based on a 5-FAM/QXL520 fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide as an MMP substrate. In the intact FRET peptide, the fluorescence of 5-FAM is quenched by QXL520. Upon cleavage into two separate fragments by MMPs, the fluorescence of 5-FAM is recovered and can be monitored. Using this approach, we showed that CAFs CMs contain higher levels of active MMPs as compared to the CMs of NFs. Moreover, the MMPs inhibitor GM6001

(Galardin/Ilomastat) which inhibits the activity of secreted MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9 and 12 strongly inhibits the MMPs activity in these CAFs CMs (Figure 4A–4B). To validate the implication of MMPs in the decreased membrane expression of MICA/B on T1 tumor cells following treatment with the CAFs CMs, CAFs CMs were then pre-treated with 50  $\mu$ M GM6001 during 15 min before incubating T1 tumor cells with these CMs during 48 hrs. Flow cytometry analysis revealed that GM6001 prevents the decrease of MICA/B surface expression induced by the CAFs CMs (Figure 5A–5B).

Together, these results indicate that melanomaassociated fibroblasts secrete high levels of active MMPs leading to a decrease of MICA/B expression at the membrane of tumor cells.

### The inhibition of matrix metalloproteinases activity in melanoma-associated fibroblasts conditioned media restores tumor cell susceptibility to NK-mediated lysis

In order to validate the implication of MMPs in the decreased susceptibility of T1 tumor cell susceptibility to NK cell-mediated lysis following treatment with the CAFs CMs, we next tested whether the restoration of MICA/B expression in the presence of the MMPs inhibitor GM6001 can increase CAFs CMs-treated tumor cell-susceptibility to NK cell-mediated killing. For this purpose, T1 tumor cells were treated with control medium or CAFs CMs in the presence or absence of 50  $\mu$ M GM6001 during 48 hrs before measuring NK92 cell cytotoxic activity.



Figure 3: Conditioned media from melanoma-associated fibroblasts decrease MICA/B expression at the surface of tumor cells. (A–C) The expression of MICA/B, ULBP1, ULBP2/5/6, ULBP3 and ULBP4 was evaluated at the surface of T1 melanoma cell line, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) or normal skin fibroblasts (NF1-3). Representative flow cytometry histograms (A) and mean  $\pm$  s.d. of percentage MICA/B (B) and ULPBs (C) positive cells from three independent experiments are shown. Gray lines in A represent the isotype controls. (D) The shedding of MICA/B at the surface of T1 tumor cells following a 48 hrs treatment with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) or with control medium, was evaluated by ELISA measuring soluble MICA (sMICA) and MICB (sMICB) concentration (pg/mL) in the cell culture supernatant. Data are represented as mean concentrations  $\pm$  s.d. from two independent experiments performed in duplicate. *P* values (B-D) were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test.

As previously described, the treatment of T1 tumor cells with CAF1-4 CMs decreases their susceptibility to NK92mediated lysis. However, the presence of the MMPs inhibitor GM6001 in the CAF1-4 CMs partially restores (~50%) the killing of T1 tumor cells by the NK92 effector cells (Figure 6A). To further validate these results, and since NKG2D engagement by MICA/B not only triggers the cytolytic activity of NK cells, but also their cytokine production, we next evaluated IFN- $\gamma$  production by NK cells isolated from a healthy donor (Nkd1) co-cultivated with T1 melanoma target cells, pre-treated with CAFs CMs or control medium, in the presence or absence of GM6001. Similarly to NK-mediated lysis, the treatment of T1 tumor cells with CAF1-4 CMs decreases the induction of IFN- $\gamma$  production by NKd1 cells after 6 hrs of co-culture (while NF1-3 CMs have no effect; Figure 6B and data not shown). Moreover, the presence of the MMPs inhibitor GM6001 partially restores the IFN- $\gamma$ production (~70%) of NKd1 cells following incubation with the CAF1-4 CMs-treated T1 target cells (Figure 6B). Together, these results correlate with the restoration of MICA/B expression at the surface of CAFs CMstreated T1 tumor cells following GM6001 treatment and demonstrate that MMPs present in the CAFs CMs are, at least partially, responsible for the decreased susceptibility of melanoma tumor cell susceptibility to NK cellmediated lysis though a diminished NKG2D-dependent NK cell activation.



(Relative Fluorescence Intensity) (A.U.)

Figure 4: Conditioned media from melanoma-associated fibroblasts contain a high level of active matrix metalloproteinases. The activity of MMPs was evaluated in the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) or normal skin fibroblasts (NF1-3) in the presence or absence of the MMPs inhibitor GM6001 by measuring the fluorescence emission of a 5-FAM/QXL520 FRET peptide as a MMP substrate. Fluorescence was measured every 10 min. A representative experiment performed in triplicate for each CMs is displayed in (A). The relative mean fluorescence intensity  $\pm$  s.d of two independent experiments, measured at the indicated time (1, 4 and 8 hrs), is represented in (B). (A.U.: arbitrary units)

#### DISCUSSION

NK cells can participate to the early immune response against melanoma and contribute to the adaptive immune response by the secretion of cytokines and by the promotion of antigen-presenting cell maturation. However, even if melanoma cells are often efficiently recognized and killed by NK cells in vitro, melanomas have developed multiple elaborated strategies to escape from NK cell-mediated destruction in vivo [54, 55]. In the present study, we provide evidence that fibroblasts isolated from melanoma tumor biopsies strongly interfere with melanoma tumor cell susceptibility to NK-mediated lysis. This suppressive effect is largely dependent on high levels of active MMPs released by melanoma-associated fibroblasts and is specific of the fibroblasts present in the tumor microenvironment because normal skin fibroblasts only minimally affect melanoma tumor cell susceptibility to NK-mediated killing.

It is now well established that different soluble factors released by tumor cells in the tumor microenvironment (i.e. TGF-β, PDGF and FGF) locally activate fibroblasts which acquire phenotypic and functional properties different from their normal counterparts [5]. In particular, when exposed to these stimuli, CAFs express proteases such as MMPs, which can favor remodeling of the extracellular matrix (ECM) and promote tumor invasion. Indeed, normal fibroblasts continually regulate and restrain the change of the ECM in healthy tissue by strictly controlling MMPs secretion and membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) expression, thereby preventing the degradation of basement membrane and consequently blocking a potential metastasis process. On the opposite, soluble factors present in the tumor microenvironment such as TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  and FGF promote the expression of MMPs by fibroblasts [56, 57]. Accordingly, we observed in our study that melanomaassociated fibroblasts secrete high level of active MMPs while normal skin fibroblasts only display minor MMPs



Figure 5: The inhibition of MMPs activity in melanoma-associated fibroblasts conditioned media restores the expression of MICA/B at the surface of tumor cells. The expression of MICA/B was evaluated at the surface of T1 melanoma cells, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) in the absence or presence of 50  $\mu$ M of the MMPs inhibitor GM6001. CAFs CMs or control medium were pre-treated with GM6001 during 15 min before starting the 48 hrs incubation period. Representative flow cytometry histograms (A) and mean  $\pm$  s.d. of percentage MICA/B positive cells (B) from three independent experiments are shown. *P* values (B) were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test. (N.S: non significant; \*\* $p < 10^{-5}$ ). Gray lines in A represent the isotype controls.

activity in their CMs. Importantly, this high level of MMPs activity in the CMs of melanoma-derived fibroblasts is associated with the decreased susceptibility of melanoma tumor cells to NK-mediated lysis, as shown by the use of the pan-MMPs inhibitor GM6001 which restores melanoma

tumor cells susceptibility to NK-mediated killing in the presence of melanoma-associated fibroblasts CMs. Of note, the inhibition of MMPs activity in the CAFs CMs using GM6001 is highly effective (Figure 4) but only partially restores melanoma tumor cell susceptibility to NK-mediated



**Figure 6:** The inhibition of MMPs activity in melanoma-associated fibroblasts conditioned media partially restores tumor cell susceptibility to NK cell-mediated lysis and interferon-g production by NK cells. (A) NK92-mediated lysis of the T1 melanoma cell line, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) in the presence or absence of the MMPs inhibitor GM6001 was evaluated by <sup>51</sup>Cr release assays at different effector:target (E:T) ratios. (B) The IFN- $\gamma$  production by NK cells isolated from a healthy donor (NKd1) was measured by flow cytometry after 6 hrs co-culture with T1 tumor cells, either untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) in the presence of the MMPs inhibitor GM6001.Co-cultures were performed in the presence of Brefedin-A to block the IFN- $\gamma$  secretion before CD56 and IFN- $\gamma$  staining. The percentage of IFN- $\gamma$  positive NK cells is represented and the mean fluorescence intensity (MF1) of IFN- $\gamma$  in CD56 positive NK cells is indicated below. Data (A–B) are the mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments. *P* values were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test. (\*p < 0.05; \*p < 0.01)

attack (Figure 6A), suggesting that MMPs may not be the sole factor involved.

With regard to the mechanism of inhibition, our data provide evidence that melanoma-associated fibroblasts, though the secretions of active MMPs, decrease MICA/B expression at the surface of melanoma tumor cells. In our model, this effect of melanoma-derived CAFs seems to be specific to these two NKG2D ligands because ULPBs expression is not affected, even if we cannot exclude that the secretion of active MMPs or other factors by CAFs might also influence the expression of other activating receptor ligands (i.e. CD112, CD155, B7-H6, HLA-E) which respectively bind to DNAM-1, NKp30 and NKG2C. Nevertheless, because the activating receptor NKG2D/NKG2DL pathway is of major importance for NK activation, cytolytic functions and cytokine secretion, the observed CAFs and MMPs-dependent decrease in MICA/B expression at the surface of melanoma tumor cells leads to a strong alteration of the NK cells cytotoxic activity against their melanoma target cells, as well as a diminished secretion of IFN- $\gamma$  by NK cells following recognition of their targets. Remarkably, this phenomenon seems to be conserved, as all the CAFs isolated from four different melanoma patient's tumor resection have the same effect on NK cell-dependent killing. Nevertheless, further studies will be needed to determine whether this phenomenon might be extended to CAFs from other tumor tissues. Of note, since NKG2D on some CD8+ T cells can trigger a co-stimulatory signal [58, 59], CAFdependent decrease of MICA/B expression at the surface of melanoma tumor cells might also affect the T celldependent immune response.

Regarding the mechanism of action of MMPs on MICA/B, a few studies have reported that the secretion or expression of these metalloproteinases by tumor cells (including the secreted MMP-2, MMP-9 and MT-MMP-14) can lead to the proteolytic cleavage/shedding of MICA/B [45-51] and possibly ULBP2 and ULBP3 [60] at their surface. Based on our results, it is likely that not only tumor cells can affect MICA/B membrane expression by the secretion of MMPs, but also stromal cells including CAFs. However, further studies will be needed to identify the exact MMPs involved in this CAFdependent process. Nevertheless, because MT-MMP-14 is normally anchored to the plasma membrane by a transmembrane and intra-cytoplasmic domain, it is unlikely that this MMP is, at least directly, involved in the shedding of MICA/B in our study which uses CMs. Moreover, GM6001 mostly inhibits the activity of secreted MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9 and 12 and almost completely prevents the shedding of MICA/B at the surface of tumor cells treated with the CAFs CMs (Figure 5), suggesting that one or several of these MMPs are involved. Moreover, RT-qPCR experiments showed that CAF1-4 mostly expressed MMP1,2,3 and 9 at the mRNA level (data not shown), narrowing the list of MMPs possibly involved in the CAF CMs-dependent shedding of MICA/B at the surface of melanoma tumor cells to MMP1,2,3 and 9.

Finally, it is important to point out that a pioneer study involving CAFs isolated from melanoma, but also other studies involving hepatocellular and colorectal carcinoma-derived fibroblasts, have shown that these cells can decrease NKp30, NKp44, DNAM-1 and/or NKG2D expression at the surface of NK cells, as well as PFN or GzmB expression [34-36]. These effects seem to be dependent, at least partially, on the secretion of PGE2 and IDO by CAFs and lead to an attenuate cytotoxic activity of NK cells against their tumor target cells. In this context, these studies and our results highlight that the CAFs secretome, especially in melanoma, profoundly alter the NK-dependent antitumor immune response by different mechanisms, including the secretion of active MMPs. Further studies will be thus required to determine whether the use of MMPs inhibitors [61] might improve the NKdependent control of tumor growth in preclinical models, or might be helpful in combination with the current immune-based anti-tumor/anti-melanoma therapies.

# **MATERIALS AND METHODS**

#### **Cell Lines**

T1 and WM17-16 melanoma tumor cells were grown in RPMI-1640/Glutamax<sup>™</sup> supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 1% sodium pyruvate (Life Technologies). The T1 tumor cell line was established from the primary lesion of a patient suffering from a melanoma [62]. The metastatic melanoma cells WM17-16 were obtained from ATCC. The NK92 cell line and NK cells isolated from healthy donors (NKd) with human CD56 positive selection kit (StemCell) were cultured in RPMI 1640/GlutaMax<sup>™</sup> supplemented with 10% of FCS and 300 U/mL rhIL2 (Sanofi).

# Isolation of melanoma-associated and normal skin fibroblasts

A panel of 4 pathology-confirmed melanoma tumor resections and 3 normal skin biopsies from healthy donors was obtained in accordance with consent procedures approved by the Gustave Roussy Institute. A mechanical dissociation by cutting and scrapping the tissue into small pieces (1–2 mm<sup>3</sup>) was performed in a 10 cm culture plate. The pieces were then distributed into a 24 wells plate and fibroblast growth medium (DMEM-F12, 10% FCS, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin) was then added. After several days, outgrowth of tumor-derived cells was observed. Tissue debris and non-adherent cells were then removed and medium changed. After 5–7 days, cells were trypsinized 2–3 min with 0.25% trypsin-EDTA until the fibroblast population was released from the plate as visually assessed by microscopy, whereas tumor cells were retained. The cell suspension was then centrifuged and fresh culture medium was added before the transfer into new wells. Because fibroblasts are highly adherents to plastic, the medium was changed after 30 min to allow the removal of the remaining tumor cells. Cells population homogeneously displaying a fibroblast-like morphology were then phenotypically characterized and assessed for purity by the analysis of the indicated informative markers.

# Preparation of fibroblast-derived conditioned media and treatment of the melanoma tumor cells

CAFs or NFs were seeded at equal density  $(2 \times 10^5 \text{ cells/well in } 12 \text{ well plates})$  and maintained in culture during 48 hrs in DMEM/F12 medium supplemented with 5% FCS. Culture supernatants were then collected and centrifuged 15 min at 2,000 rpm to remove cell debris. These supernatants, considered as conditioned media (CM), were then immediately used or frozen at -20°C for subsequent use. The treatment of T1 or WM17-16 tumor cells with the CMs was performed during 48hrs.

## Flow cytometry analysis

Phenotypic analyses of tumor cells, NK cells or fibroblasts were performed by direct or indirect immunostaining. Briefly,  $0.2 \times 10^6$  cells were stained with the following Abs: rabbit anti-FSP-1/S100A4 mAb (clone EPR2761, Abcam); rabbit anti-vimentin mAb (clone SP20, Abcam); PE-conjugated mouse anti-human E-Cadherin/ CD324 mAb (clone 67A4, Biolegend); Alexa Fluor® 488-conjugated mouse anti-human CD31 (clone M89D3, BD Pharmingen); FITC-conjugated mouse anti-CD34 mAb (clone AC136, Miltenyi Biotec.); PE-conjugated mouse antihuman CD45RO mAb (clone UCHL1, DakoCytomation); PE-conjugated mouse anti-MICA/B mAb (clone 6D4; Biolegend); PE-conjugated mouse anti-human ULBP-1 mAb (clone 170818); APC-conjugated mouse anti-human ULBP-2/5/6 mAb (clone 165903); PE-conjugated mouse anti-human ULBP-3 mAb (clone 166510); PE-conjugated mouse anti-human ULBP-4 mAb (clone 709116) (R&D systems); mouse anti-ICAM-1/CD54(clone 25D7); PEconjugated mouse anti-NKG2D mAb (clone ON72, Beckman Coulter); Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-conjugated goat antirabbit Ab (Life Technologies). For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized with CytoFix/CytoPerm solution (BD Biosciences). Extracellular staining were performed at 4°C. Acquisitions were performed using a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) and data were processed using the FlowJo program.

#### Fluorescence microscopy

Cells were grown on rat collagen-coated glass coverslips (Sigma) and fixed for 20 min in PBS/2% PFA, washed and incubated 20 min in PBS/50 mM NH4Cl. Cells were then washed with PBS, permeabilized for 5 min in PBS/0.2% Triton X-100. After 2 washes in PBS, coverslips were placed in blocking solution (PBS/10% FCS) for 30 min, washed once in PBS and incubated for 1 hr at RT with mouse anti- $\alpha$ -SMA mAb (clone 4A4, Abcam) and rabbit anti-Vimentin mAb (clone SP20, Abcam) in incubation buffer (PBS/0.05% Triton X-100). Cells were then washed 3 times with incubation buffer and incubated 1 hr at RT with goat Alexa-Fluor 488 and Alexa-Fluor 647-conjugated secondary antibody (Life Technologies) in incubation buffer containing 5% FCS. Cells were then washed 3 times in PBS and mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) before imaging (IX83 microscope; Olympus) and analysis (CellSense Dimension software, Olympus).

# Western blot

Total cellular extracts were prepared by lysing cells in RIPA buffer (Pierce) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche) and 2 mM sodium orthovanadate before denaturation by boiling in Laemmli buffer and SDS-PAGE separation on 4–20% precast gels (Biorad). Blots were probed with the following Ab: anti- $\alpha$ -SMA mouse mAb (clone 4A4, Abcam), anti-Vimentin rabbit mAb (clone SP20, Abcam), HRP-conjugated anti-actin mouse mAb (clone AC-74, Sigma), HRP-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit Ab (Santa Cruz Bio.). Western blot quantification was performed using the Image-J densitometry software.

## Chromium release assay

Cytotoxicity was measured by a 4 hr chromium release assay as previously described [63]. Experiments were performed in triplicate. Data are expressed as the percentage of specific <sup>51</sup>Cr release from target cells, calculated as (experimental release-spontaneous release)/ (maximum release-spontaneous release) × 100. In some experiments, the inhibition of the PFN/Gzm-mediated cytotoxic pathway was performed by using NK effector cells pre-incubation for 2 hr with 100 nM concanamycin A (CMA)(Sigma-Aldrich) (concentration of CMA during lysis: 50 nM). The inhibition of the NKG2D-dependent cytotoxic was performed by using NK effector cells pre-incubation for 30 min with 0.5 µg/mL anti-NKG2D blocking mAb (clone Bat-221; Miltenyi Biotec.) which was maintained at the same concentration during lysis.

# Measurement and inhibition of MMPs activity in conditioned media

The metalloproteinases activity in CAFs and NFs CMs was measured using the fluorometric SensoLyte® 520 Generic MMP Activity Kit (AnaSpec) according to a modified manufacturer protocol. Briefly, the supernatants of CAFs or NFs (cultured during 48 hrs without FCS) were collected and centrifuged for 10-15 min at 1,000 g at 4°C. MMPs substrate and MMPs diluents were then mixed together (50  $\mu$ L) in a 96 wells plate before adding 50 µL of the freshly prepared CAFs or NFs CMs to initiate the enzymatic reaction. Fluorescence was then immediately measured and monitored every 10 min at Ex/Em = 490/520 nm during 8 hrs using a FLUOstar Optima microplate reader (BMG Labtech). In some experiments, the MMPs inhibitor GM6001 (Galardin/ Ilomastat) (Santa Cruz Bio.) was used at 50 µM to pretreat the fibroblasts CMs during 15 min. GM6001 was maintained at the same concentration during the 48 hrs treatment of T1 target cells with the fibroblast CMs or during the measurement of MMPs activity.

## MICA and MICB ELISA

 $0.1 \times 10^6$  T1 target cells were treated in 12-w plates during 48 hrs with 500 µL DMEM/F12 medium supplemented with 5% FCS (ctrl) or with the CAFs CMs. The cell culture supernatants were then immediately frozen at -80°C. Soluble MICA and MICB concentration in these supernatants were independently measured by ELISA (Thermo Scientific) according to the manufacturer recommendations.

## Analysis of IFN-γ production by NK cells

T1 melanoma cell line, untreated or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media of CAFs (CAF1-4) in the presence or absence of the MMPs inhibitor GM6001 (50  $\mu$ M) were co-cultivated during 6 hrs with resting NK cells isolated from a healthy donor (NKd1) at the effector:target ratio of 3:1. Co-cultures were performed in the presence of 10  $\mu$ g/mL Brefeldin-A (Sigma) to inhibit IFN- $\gamma$  secretion. After 6 hrs, cells were harvested, washed with PBS and stained on ice with A488-conjugated mouse anti-CD56 mAb (clone B159; BD Biosciences). Cells were then washed 3 times with PBS, permeabilized with CytoFix/CytoPerm solution (BD Biosciences) and stained with APC-conjugated mouse anti-IFN- $\gamma$  mAb (clone B27; BD Biosciences) before flow cytometry analysis of IFN- $\gamma$  positive cells, gating on CD56<sup>+</sup> NK cells.

## Detection of effector /target cell conjugates

Control or CMs pre-treated T1 and NK92 cells were respectively stained during 10 min with the lypophilic dyes DiO or DiD (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions and washed 3 times with warm culture medium. T1 target cells were then incubated with NK92 effector cells at the effector:target ratio of 3:1 in  $Ca^{2+}$  free medium (HBSS with 10 mM Hepes pH7.5, 0.4% BSA) during 30 min at 37°C to allow conjugate formation before flow cytometry analysis.

### **Apoptosis assays**

To assess PFN/GzmB-dependent apoptosis, T1 cells incubated for 2 hr at 37°C with buffer or sublytic PFN  $\pm$  50 nM hGzmB, were analyzed for caspase activation by flow cytometry using M30-FITC mAb staining (M30 CytoDEATH, Roche) to detect an effector caspase-cleavage product of cytokeratin 18, as previously described [37, 38]. Native rat PFN was purified from RNK16 cells and native hGzmB was purified from YT-Indy cells as described [64].

## Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (s.d.). *P* values were determined by unpaired two-tailed student's *t* tests.

# Abbreviations

CAF, Cancer-Associated Fibroblast; CM, Conditioned Medium; Gzm, Granzyme; IFN-γ, Interferon gamma; MICA/B, MHC class I polypeptide-related protein A and B; MMP, Matrix metalloproteinase; NF, Normal Fibroblast; NK, Natural Killer cell; NKG2D, Natural Killer Group 2 member D; PFN, Perforin; ULBP, HCMV UL16-binding proteins.

# ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Cherier (CRCT-INSERM UMR 1037, Toulouse, France) for helpful discussion and for technical advices regarding CAFs isolation and culture. We thank N. Kamsu-Kom (INSERM U981, Villejuif, France) for assistance with the melanoma tumor biopsies and M. Khaled (INSERM U1186, ATIP-AVENIR TEAM, Villejuif, France) for technical advices regarding the measurement of MMPs activity. We thank D. Martinvalet (University of Geneva, Switzerland) for the human GzmB.

# **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflicts of interest.

# Authors' contributions

L.Z. performed experiments and analyzed data. T.B.S.S. and J.G. helped with some experiments. A.C. provided normal tissue biopsies. C.R. provided melanoma tumor biopsies. G.F. participates to helpful discussion. S.C. participates to helpful discussion and edited the manuscript. J.T. conceived and supervised the project, helped designing experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

# FUNDING

This work was supported by INSERM and the french "Ligue Nationale Contre Le Cancer" (LNCC-Equipe Labéllisée). L.Z is supported by a PhD training fellowship from the french "Ligue Nationale Contre Le Cancer" and T.B.S.S. by a PhD training fellowship from the "Association pour la Recherche contre le Cancer" (ARC).

## REFERENCES

- Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour microenvironment heterogeneity on therapeutic response. Nature. 2013; 501:346–54. doi: 10.1038/nature12626.
- Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. Oncogene. 2008; 27:5904–12. doi: 10.1038/onc.2008.271.
- Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. Semin Cell Dev Biol. 2010; 21:33–9. doi: 10.1016/j. semcdb.2009.10.010.
- Madar S, Goldstein I, Rotter V. 'Cancer associated fibroblasts'—more than meets the eye. Trends Mol Med. 2013; 19:447–53. doi: 10.1016/j.molmed.2013.05.004.
- Ohlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. J Exp Med. 2014; 211:1503–23. doi: 10.1084/jem.20140692.
- Elkabets M, Gifford AM, Scheel C, Nilsson B, Reinhardt F, Bray MA, Carpenter AE, Jirstrom K, Magnusson K, Ebert BL, Ponten F, Weinberg RA, McAllister SS. Human tumors instigate granulin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. J Clin Invest. 2011; 121:784–99. doi: 10.1172/ JCI43757.
- Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulsom R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. Cancer Res. 2004; 64:8492–5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1708.
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. Cancer Res. 2007; 67:10123–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3127.
- Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, Onder TT, Wang ZC, Richardson AL, Weinberg RA, Orimo A. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. Proc

Natl Acad Sci USA. 2010; 107:20009-14. doi: 10.1073/ pnas.1013805107.

- Rasanen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. Exp Cell Res. 2010; 316:2713–22. doi: 10.1016/j. yexcr.2010.04.032.
- Orimo A, Tomioka Y, Shimizu Y, Sato M, Oigawa S, Kamata K, Nogi Y, Inoue S, Takahashi M, Hata T, Muramatsu M. Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression. Clin Cancer Res. 2001; 7:3097–105. doi:
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell. 2005; 121:335–48. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.
- Guo X, Oshima H, Kitmura T, Taketo MM, Oshima M. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. J Biol Chem. 2008; 283:19864–71. doi: 10.1074/jbc.M800798200.
- Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. Cancer Res. 2010; 70:6945–56. doi: 10.1158/0008-5472. CAN-10-0785.
- Cai J, Tang H, Xu L, Wang X, Yang C, Ruan S, Guo J, Hu S, Wang Z. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. Carcinogenesis. 2012; 33:20–9. doi: 10.1093/carcin/bgr230.
- 16. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. Am J Cancer Res. 2011; 1:482–97. doi:
- Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. Semin Cell Dev Biol. 2010; 21:19–25. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.10.002.
- Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Kloppel G, Kalthoff H, Folsch UR, Schafer H. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukinlbeta. Cancer Res. 2004; 64:1331–7. doi:
- Harper J, Sainson RC. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. Semin Cancer Biol. 2014; 25:69–77. doi: 10.1016/j. semcancer.2013.12.005.
- Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, Gopinathan A, Tuveson DA, Fearon DT. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. Science. 2010; 330:827–30. doi: 10.1126/science.1195300.
- Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limon P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. Nat Rev Immunol. 2010; 10:554–67. doi: 10.1038/nri2808.

- Seeger P, Musso T, Sozzani S. The TGF-beta superfamily in dendritic cell biology. Cytokine Growth Factor Rev. 2015; 26:647–57. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.06.002.
- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. J Immunol. 2004; 172:5149–53. doi:
- 24. Nazareth MR, Broderick L, Simpson-Abelson MR, Kelleher RJ, Jr., Yokota SJ, Bankert RB. Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. J Immunol. 2007; 178:5552–62. doi:
- Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. Cancer Cell. 2005; 8:369–80. doi: 10.1016/j. ccr.2005.10.012.
- Park YP, Choi SC, Kiesler P, Gil-Krzewska A, Borrego F, Weck J, Krzewski K, Coligan JE. Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the gammac cytokines and TGF-beta1. Blood. 2011; 118:3019–27. doi: 10.1182/blood-2011-04-346825.
- Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. Nat Immunol. 2005; 6:600–7. doi: 10.1038/ni1197.
- Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:4120–5. doi: 10.1073/ pnas.0730640100.
- 29. Voron T, Marcheteau E, Pernot S, Colussi O, Tartour E, Taieb J, Terme M. Control of the immune response by proangiogenic factors. Front Oncol. 2014; 4: 70. doi: 10.3389/ fonc.2014.00070.
- Comito G, Giannoni E, Segura CP, Barcellos-de-Souza P, Raspollini MR, Baroni G, Lanciotti M, Serni S, Chiarugi P. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. Oncogene. 2014; 33:2423–31. doi: 10.1038/ onc.2013.191.
- Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. J Biol Chem. 2009; 284:34342–54. doi: 10.1074/jbc.M109.042671.
- 32. Chun E, Lavoie S, Michaud M, Gallini CA, Kim J, Soucy G, Odze R, Glickman JN, Garrett WS. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. Cell Rep. 2015; 12:244–57. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.024.

- Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards RP, Kalinski P. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. Cancer Res. 2011; 71:7463–70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2449.
- 34. Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, Queirolo P, Vermi W, Facchetti F, Moretta A, Moretta L, Mingari MC, Vitale M. Melanomaassociated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:20847–52. doi: 10.1073/pnas.0906481106.
- Li T, Yang Y, Hua X, Wang G, Liu W, Jia C, Tai Y, Zhang Q, Chen G. Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. Cancer Lett. 2012; 318:154–61. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.020.
- 36. Li T, Yi S, Liu W, Jia C, Wang G, Hua X, Tai Y, Zhang Q, Chen G. Colorectal carcinoma-derived fibroblasts modulate natural killer cell phenotype and antitumor cytotoxicity. Med Oncol. 2013; 30: 663. doi: 10.1007/s12032-013-0663-z.
- Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers FC, Bjorklund B, Nap M, Jornvall H, Schutte B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. J Pathol. 1999; 187:567–72. doi:
- Thiery J, Keefe D, Saffarian S, Martinvalet D, Walch M, Boucrot E, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. Blood. 2010; 115:1582–93. doi: 10.1182/blood-2009-10-246116.
- Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. Nat Rev Immunol. 2012; 12:239–52. doi: 10.1038/ nri3174.
- Zhang J, Basher F, Wu JD. NKG2D Ligands in Tumor Immunity: Two Sides of a Coin. Front Immunol. 2015; 6: 97. doi: 10.3389/fimmu.2015.00097.
- Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. Annu Rev Immunol. 2013; 31:413–41. doi: 10.1146/ annurev-immunol-032712-095951.
- 42. Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M, Meyermann R, Waldhauer I, Steinle A, Weller M, Friese MA. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. Brain. 2006; 129:2416–25. doi: 10.1093/brain/awl205.
- 43. Schwinn N, Vokhminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I, Nausch N, Tuettenberg J, Steinle A, Cerwenka A, Schadendorf D, Paschen A. Interferon-gamma downregulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytolysis of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. Int J Cancer. 2009; 124:1594–604. doi: 10.1002/ijc.24098.
- 44. Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. Cancer Immun. 2013; 13:8. doi:

- 45. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: downregulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. J Immunol. 2002; 169:4098–102. doi:
- 46. Lee BK, Kim MJ, Jang HS, Lee HR, Ahn KM, Lee JH, Choung PH. A high concentration of MMP-2/gelatinase A and MMP-9/gelatinase B reduce NK cell-mediated cytotoxicity against an oral squamous cell carcinoma cell line. In Vivo. 2008; 22:593–7. doi:
- Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. Hum Immunol. 2006; 67:188–95. doi: 10.1016/j.humimm.2006.02.008.
- Le Maux Chansac B, Misse D, Richon C, Vergnon I, Kubin M, Soria JC, Moretta A, Chouaib S, Mami-Chouaib F. Potentiation of NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma: role of NKG2D-dependent pathway. Int Immunol. 2008; 20:801–10. doi: 10.1093/ intimm/dxn038.
- Sun D, Wang X, Zhang H, Deng L, Zhang Y. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. Cell Biol Int. 2011; 35:569–74. doi: 10.1042/CBI20100431.
- 50. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H, Terada N. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 mRNA by valproic acid plays a role in inhibiting the shedding of MHC class I-related molecules A and B on the surface of human osteosarcoma cells. Oncol Rep. 2012; 28:1585–90. doi: 10.3892/or.2012.1981.
- 51. Liu G, Atteridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chainrelated molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. J Immunol. 2010; 184:3346–50. doi: 10.4049/jimmunol.0903789.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8:221–33. doi: 10.1038/ nrm2125.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell. 2010; 141:52–67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
- Tarazona R, Duran E, Solana R. Natural Killer Cell Recognition of Melanoma: New Clues for a More Effective Immunotherapy. Front Immunol. 2015; 6:649. doi: 10.3389/ fimmu.2015.00649.

- Burke S, Lakshmikanth T, Colucci F, Carbone E. New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. Trends Immunol. 2010; 31:339–45. doi: 10.1016/j.it.2010.06.003.
- Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. J Cell Sci. 2005; 118:2143–53. doi: 10.1242/jcs.02334.
- 57. Andersen K, Maelandsmo GM, Hovig E, Fodstad O, Loennechen T, Winberg JO. Interleukin-1 alpha and basic fibroblast growth factor induction of matrix metalloproteinases and their inhibitors in osteosarcoma cells is modulated by the metastasis associated protein CAPL. Anticancer Res. 1998; 18:3299–303. doi:
- Verneris MR, Karimi M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. Blood. 2004; 103:3065–72. doi: 10.1182/blood-2003-06-2125.
- Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE, Borrego F. NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. J Immunol. 2005; 174:4480–4. doi:
- 60. Shiraishi K, Mimura K, Kua LF, Koh V, Siang LK, Nakajima S, Fujii H, Shabbir A, Yong WP, So J, Takenoshita S, Kono K. Inhibition of MMP activity can restore NKG2D ligand expression in gastric cancer, leading to improved NK cell susceptibility. J Gastroenterol. 2016. doi: 10.1007/s00535-016-1197-x.
- 61. Vandenbroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? Nat Rev Drug Discov. 2014; 13:904–27. doi: 10.1038/nrd4390.
- Dufour E, Carcelain G, Gaudin C, Flament C, Avril MF, Faure F. Diversity of the cytotoxic melanoma-specific immune response: some CTL clones recognize autologous fresh tumor cells and not tumor cell lines. J Immunol. 1997; 158:3787–95. doi:
- Ben Safta T, Ziani L, Favre L, Lamendour L, Gros G, Mami-Chouaib F, Martinvalet D, Chouaib S, Thiery J. Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. J Immunol. 2015; 194:418–28. doi: 10.4049/jimmunol.1401978.
- 64. Thiery J, Walch M, Jensen DK, Martinvalet D, Lieberman J. Isolation of cytotoxic T cell and NK granules and purification of their effector proteins. Curr Protoc Cell Biol. 2010; Chapter 3: Unit 3.37. doi:

Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK cell-mediated killing through matrix-metalloproteinases secretion

**Supplementary Materials** 



Supplementary Figure 1: Conditioned media from melanoma-associated fibroblasts decrease the susceptibility of WM17-16 melanoma tumor cells to NK-mediated killing. The lysis of the WM17-16 melanoma cell line, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) (A) or normal skin fibroblasts (NF1-3) (B) by NK cells isolated from a healthy donor (NKd1) was evaluated by <sup>51</sup>Cr release assays at different effector:target (E:T) ratios. Data are the mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments. Experiments in (A–B) were performed at the same time but separated in two different panels. (C) represents the mean  $\pm$  s.d. of all the NKd-mediated lysis experiments from (A-B) using the CAFs or NFs pre-treatments of the WM17-16 tumor cell line. *P* values (C) were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test comparing the control and CAFs CMs pre-treatments. (\*\* $p \leq 0.0001$ ).



Supplementary Figure 2: Conditioned media from melanoma-associated fibroblasts do not alter the formation of conjugates between T1 target cells and NK92 effector cells. (A–B) CAF1-4 or NF1-3 CMs pre-treated T1 or control cells, stained with the lypophilic dyes DiO were incubated with NK92 effector cells, stained with the lypophilic dyes DiD, at the effector:target ratio of 3:1 during 30 min before measuring immune conjugates formation by flow cytometry. Isolated T1 and NK92 were used as control to identify the two separated populations. The percentage of T1 cells conjugated with NK92 cells was calculated by gating on T1 cells and on measuring the percentage of DiO/DiD double positive population representing the immune conjugates. Representative flow cytometry dot plots (A) and mean  $\pm$  s.d. of percentage T1 cells conjugated with NK92 cells (B) from three independent experiments are shown. (C) ICAM-1 expression was evaluated by flow cytometry at the surface of control, CAF1-4 or NF1-3 CMs pre-treated T1 tumor cells. Data are the mean  $\pm$  s.d. of percentage ICAM-1 positive T1 cells from three independent experiments. *P* values (B–C) were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test. (N.S: non significant).



Supplementary Figure 3: NK-mediated lysis of T1 tumor cells is mainly dependent on the Perforin/Granzymes pathway but conditioned media from melanoma-associated fibroblasts do not alter the susceptibility of T1 cells to Perforin/Granzyme B-mediated apoptosis. (A) T1 tumor cells are killed by NK cells using the Perforin/Granzymes (PFN/Gzm) pathway. The lysis of the T1 melanoma cell line by NK cells (NK92 or NK cells isolated from two healthy donors (NKd1 and NKd2)) was evaluated by <sup>51</sup>Cr release assays at different effector:target (E:T) ratios. Pre-incubation of NK cells with 100 nM concanamycin A (CMA) (concentration of CMA during lysis: 50 nM), which inhibits calcium-dependent experiments performed in triplicate. (B) Conditioned media from CAFs do not reduce the susceptibility of T1 cells to PFN/GzmB-mediated apoptosis. T1 cells untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) or normal skin fibroblasts (NF1-3) were treated with PFN  $\pm$  50 nM hGzmB during 2 hrs. Apoptosis was measured by flow cytometry using M30 mAb staining (which recognizes a cytokeratin-18 epitope, revealed after effector caspase cleavage). Mean  $\pm$  s.d. of percentage M30 positive cells from three independent experiments are shown. *P* values were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test. (N.S: non significant).



Supplementary Figure 4: NK-mediated lysis of T1 tumor cells is dependent on the NKG2D pathway. (A) NK92 and NK cells isolated from two healthy donors (NKd1 and NKd2) express the NKG2D activating receptor. Representative flow cytometry histograms from two independent experiments are shown. Gray lines represent the isotype controls. (B) Blocking NKG2D reduces T1 susceptibility to NK cell-mediated lysis. NK92, NKd1 or NKd2 effector cells were pre-incubated with 0.5  $\mu$ g/mL anti-NKG2D blocking mAb (which was maintained at the same concentration during lysis) before incubation with T1 target cells. T1 lysis was evaluated by <sup>51</sup>Cr release assays at the effector:target (E:T) ratios of 30:1. Data are the mean ± s.d. from two independent experiments performed in triplicate. *P* values were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test. (\*\*p < 0.001)

II. Mise en évidence de l'influence de l'hypoxie sur les capacités immunomodulatrices des fibroblastes associés au mélanome

# Objectif des travaux et résumé des résultats

L'hypoxie est une composante intégrale du microenvironnement tumoral et influence plusieurs paramètres biologiques pouvant modifier le potentiel malin de la tumeur et sa résistance aux thérapies anti-tumorales. L'hypoxie joue également un rôle dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale sur différentes populations immunitaires. De la même manière, les CAFs jouent un rôle clé au sein du microenvironnement tumoral et contribuent à l'initiation et la progression maligne et participent à l'immunosuppression au sein du stroma par la sécrétion de divers facteurs solubles. Bien évidemment, l'ensemble des composants du microenvironnement tumoral peuvent être étudiés de façon indépendante, mais il est également évident qu'au sein de ce stroma tumoral, ses différentes composantes établissent un dialogue complexe, s'influençant mutuellement (on parle alors de « crosstalk »).

Compte tenu de ces différentes données, et de l'absence de travaux à ce sujet, nous nous sommes donnés comme objectif de déterminer si l'hypoxie pouvait influencer la fonctionnalité des CAFs au sein du microenvironnement tumoral, et notamment leur capacités immuno-modulatrices.

Dans ce cadre, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au mélanome. Grace à une approche d'immunohistochimie et à une cohorte de neufs patients atteints de mélanome métastatique, nous avons pu mettre en évidence la présence de fibroblastes activés au sein de zones tumorales hypoxiques. De plus, à partir de cinq cultures primaires de fibroblastes de mélanome que nous avons isolés puis placés en hypoxie *in vitro*, nous avons effectué une analyse transcriptomique globale et des qRT-PCR. Nos résultats suggèrent d'une part que l'hypoxie augmente l'activation des fibroblastes, et d'autre part augmente l'expression par les CAFs de différents gènes codant pour des protéines connues pour avoir des fonctions immuno-modulatrices.

Nos résultats, qui restent néanmoins à compléter, suggèrent donc que l'hypoxie pourrait jouer un rôle clé sur la fonctionnalité des CAFs au sein du microenvironnement tumoral, en augmentant notamment leurs capacités immuno-suppressives.

# Matériels et méthodes

## Isolation et culture de fibroblastes associés au mélanome

Un panel de 5 résections tumorales de mélanome métastatique a été obtenu selon les procédures de consentement approuvées par l'Institut Gustave Roussy. Une dissociation mécanique par découpage du tissu en petits morceaux (1-2 mm<sup>3</sup>) a été effectuée dans une plaque de culture de 10 cm de diamètre. Les morceaux ont ensuite été répartis dans une plaque de 24 puits et un milieu de croissance des fibroblastes (DMEM-F12, 10% de SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine) a ensuite été ajouté. Après plusieurs jours, la croissance des cellules dérivées de tumeurs a été observée. Les débris tissulaires et les cellules non adhérentes ont ensuite été éliminés et le milieu a été changé. Après 5 à 7 jours, les cellules ont été trypsinées 2 à 3 min avec 0,25% de trypsine-EDTA jusqu'à ce que la population fibroblastique soit détachée de la plaque et évaluée visuellement par microscopie (tandis que les cellules tumorales sont retenues). La suspension de cellules a ensuite été centrifugée et du milieu de culture frais a été ajouté avant le transfert dans de nouveaux puits. Comme les fibroblastes sont très adhérents au plastique, le milieu a été changé après 30 min pour permettre l'élimination des cellules tumorales restantes. La population de cellules présentant de manière homogène une morphologie fibroblastique a ensuite été caractérisée phénotypiquement et leur pureté a été analysée à l'aide des marqueurs indiqués.

#### Maintien en culture des fibroblastes

Les fibroblastes associés au mélanome ont été cultivés dans le milieu DMEM/F12 supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal), 100 U / ml de pénicilline, 100 mg / ml de streptomycine (Life Technologies).

#### Mise en hypoxie des fibroblastes isolés

Les cultures primaires de CAFs ont été mises en conditions hypoxiques (48 hrs) dans une enceinte d'hypoxie (InVivo<sub>2</sub> 400 Hypoxia Workstation; Ruskinn) permettant de moduler la pression partielle en oxygène lors de la culture cellulaire, dans une atmosphère humidifiée contenant (5% de CO<sub>2</sub> et 1% d'O<sub>2</sub> à 37°C). Au terme des 48 hrs de culture, les extractions protéiques ou les extractions d'ARNm ont été réalisées alors que les fibroblastes étaient dans l'enceinte à hypoxie afin d'éviter toute réoxygénation et de conserver l'intégrité des protéines/ARN d'intérêt.

## Analyse en cytométrie en flux

Les analyses phénotypiques des fibroblastes ont été réalisées par immuno-marquage direct ou indirect. Brièvement,  $0.2 \times 10^6$  cellules ont été marquées avec les anticorps (Ac) suivants: Ac

monoclonal de lapin anti-FSP-1/S100A4 (clone EPR2761, Abcam); Ac monoclonal de lapin antivimentine (clone SP20, Abcam); Ac monoclonal de souris conjugué à PE anti-E-cadhérine/CD324 (clone 67A4, Biolegend); Ac de souris conjugué à Alexa Fluor® 488 anti-CD31 (clone M89D3, BD Pharmingen); Ac monoclonal de souris conjugué à FITC anti-CD34 (clone AC136, Miltenyi Biotec.); Ac monoclonal de souris conjugué à PE anti-CD45RO (clone UCHL1, DakoCytomation).

#### Western Blot

Des extraits cellulaires totaux ont été préparés en lysant des CAFs dans un tampon RIPA (Pierce) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche) et 2 mM d'orthovanadate de sodium avant dénaturation à 95°C dans du tampon Laemmli. Les échantillons ont été ensuite séparés par une approche de SDS-PAGE (gels en gradient 4-20%). Les anticorps utilisés pour la révélation sont les suivants : Ac monoclonal de souris anti-HIF-1 $\alpha$  (clone 54, BD Biosciences 610959), Ac monoclonal de souris anti- $\alpha$ -SMA (clone 4A4, Abcam), Ac monoclonal de lapin anti-vimentin (clone SP20, Abcam), Ac monoclonal de souris anti-actine conjugué au HRP (clone AC-74, Sigma), Ac anti-souris ou anti-lapin de chèvre conjugué à HRP (Santa Cruz Bio). La quantification a été effectuée en utilisant le logiciel de densitométrie Image-J.

#### Marquage immunohistochimique

Des coupes de biopsies de mélanomes métastatiques ont été obtenues selon les procédures de consentement approuvées par l'Institut Gustave Roussy. Les coupes en séries ont été incluses en blocs de paraffine et ont été marquées soit avec un Ac monoclonal de lapin anti-FSP-1 (S100A4) (ab124805, Abcam), un Ac monoclonal de souris anti-α-SMA (ab119952, Abcam) ou un Ac polyclonal de lapin anti-Carbonic Anhydrase IX (CA9) (ab15086, Abcam). Pour chaque tumeur de patient, une coupe a été colorée avec de l'hématoxyline-éosine-safran (HES). Les coupes (4 µm d'épaisseur) ont été montées sur lame de poly-lysine-L, déparaffinées et réhydratées par du xylène et de l'éthanol. Le démasquage des antigènes a été effectué dans un tampon citrate (pH 6) pour tous les Ac pendant 30 min dans un bain-marie à 98°C. Les protéines non spécifiques ont été bloquées pendant 10 minutes avec une solution bloquante (PV6122; MM France). Les coupes ont été incubées avec les anticorps primaires pendant 1h à température ambiante. Une immuno-coloration en rouge permanent a été réalisée pour révéler l'activité de la phosphatase couplée à l'anticorps secondaire grâce à une incubation avec le kit polink-2 plus AP Mouse with Permanent Red (D69-6; GBI Labs) pour l'α-SMA et le kit polink-2 plus AP Rabbit with Permanent Red (GBI Labs; D70-6) pour FSP-1 et CA9 (selon le protocole du fournisseur). Du lévamisole (X3021, Dako) a ensuite été ajouté pour inhiber l'activité des phosphatases alcalines endogènes. Chaque étape a été suivie de lavages dans du « supersensitive wash buffer » (TRB ; HK583-5K, MM France). Les coupes ont été contre-colorées avec de l'hémalun de Mayer (VWR) puis montées avec le milieu de montage Diamount (F/030400, MM France). Les contrôles négatifs ont été réalisés en remplaçant les anticorps primaires avec un contrôle isotypique (IgG de lapin, IgG1 de souris ou IgG de lapin pour FSP-1,  $\alpha$ -SMA et CA9 respectivement). Des lames de carcinome rénal mutés HIF-1 $\alpha$  ont été utilisées comme contrôles positifs pour le marquage CA9. Pour tous les marquages, les lames entières ont été numérisées en utilisant un scanner de lames (VS120, Olympus). L'analyse des marquages a été effectuée par deux anatomo-pathologistes.

#### Analyse transcriptomique

Les échantillons d'ARN ont été obtenus à partir de 0.25x10<sup>6</sup> CAFs maintenus en hypoxie et 0.125x10<sup>6</sup> CAFs maintenus en normoxie. L'ensemble des échantillons ont été préparés à partir de fibroblastes à bas passages (similaires entre les différentes cultures primaires). Le nombre moins élevé de cellules en normoxie avant les 48 hrs d'incubation permet d'éviter une pseudo-hypoxie due à une confluence trop élevée au terme des 48hrs de culture. L'extraction des ARNs a été réalisée avec du TRIzol TriReagent Sigma (T9427, Sigma) et a permis d'obtenir entre 1000 et 2000 ng d'ARN pour l'analyse transcriptomique (cDNA microarray). L'analyse transcriptomique a été réalisée en simple couleur par une approche de type Agilent. Cette analyse a été financée dans le cadre de l'appel d'offre "Taxe d'Apprentissage 2016" (Direction de la Recherche-Institut Gustave Roussy).

#### **RT-PCR** quantitative en temps réel

Les ARN totaux ont été extraits à partir de CAF avec du TRIzol TriReagent (T9427, Sigma). 1 mg d'ARN totaux a été converti en ADN complémentaire en utilisant le kit de synthèse d'ADNc Maxima First (K1671, Thermo scientific). La PCR quantitative a été réalisée en utilisant du SYBR Green select master mix (4472908, Applied Biosystems). La spécificité des amplicons de PCR a été confirmée par analyse de la courbe de fusion. L'expression des gènes cibles a été étalonnée par rapport au gène qui code pour l'ARNr de la petite sous-unité 18S. L'expression relative des gènes testés a été calculée en utilisant la valeur du cycle de seuil cible (Ct) et de la méthode  $2^{-\Delta Ct}$ . Pour chaque gène, la valeur du Ct est la moyenne de trois mesures indépendantes. Les séquences d'amorces utilisées sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Nom du gène	Amorces sens	Amorces anti-sens
FAP	gggatggtcattgccttggt	ctccataggaccagccccata
ARG1	cctcctgaaggaactaaaaggaa	ccttggcagatatacagggagt
TGFB1	gcaacaattcctggcgatacct	gctaaggcgaaagccctcaat
TGFB2	ccaaagggtacaatgccaac	cagatgcttctggatttatggtatt
CXCL12	tgtgcccttcagattgtagcc	atccactttagcttcgggtcaa
MMP2	ggccctgtcactcctgagat	ggcatccaggttatcgggga
MMP9	gctcaccttcactcgcgtgta	tccgtgctccgcgaca
LGALS9	cgtcaatggctctgtgcagctgtc	agatccacactgagaagctctggc
IL10	gatgccttcagcagagtgaa	gcaacccaggtaacccttaaa
IL6	cgccaatggcactcccaaagttta	tgggtctgaagcacgattcctcaa
PTGS2 (Cox2)	cttcacgcatcagtttttcaag	tcaccgtaaatatgatttaagtccac
CA9	ggtgtcatctggactgtgttt	ggtgtcagagagggtgtggag
PDK1	gttcatgtcacgctgggtaa	ggaggtetcaacacgaggte
PDL-1	tatggtggtgccgactacaa	tgettgtccagatgaetteg
PDL-2	Acccaggacccatccaactt	ctcccaagaccacaggttcaga
VEGF	gcacccatggcagaagg	ctcgattggatggcagtag
SLC2A1 (Glut-1)	gattggctccttctctgtgg	tcaaaggacttgcccagttt
ENTPD1 (CD39)	actatcaacaatgccatcaaagc	attgaaggcacactgggagt
LGALS3	cttctggacagccaagtgc	aaaggcaggttataaggcacaa
IL19	cagagtcatccatgacaactatgat	cgagctctcccagggatt
FASLG	gagetggcagaacteegaga	gtggactggggtggccta
CCL17	gatgctggccctggtcac	acattggtccctcgagctg
18S	cggacaggattgacagattg	caaatcgctccaccaact

# Analyse statistique

Les données présentées sont exprimées sous forme de moyennes  $\pm$  écart type (sd). Les « p-values » ont été déterminées par un test de Student (*t*-test). Les données dont la valeur de la p-value est inférieure à 0.05 ont été considérées comme significatives.

## **Résultats**

# 1) Mise en évidence de la présence de fibroblastes activés au niveau de zones hypoxiques de mélanome métastatique

Compte tenu de notre objectif de déterminer si l'hypoxie influence la fonctionnalité des CAFs au sein du microenvironnement tumoral, et notamment leur capacités immuno-modulatrices, nous avons dans un premier temps évalué la présence de CAFs au sein des zones hypoxiques à partir de biopsies tumorales d'une cohorte de neufs patients atteints de mélanome métastatique. Nous avons ainsi réalisé une étude en immunohistochimie de l'expression des marqueurs CA9 (Carbonic anhydrase 9; une cible transcriptionnelle du facteur inductible de l'hypoxie HIF-1 $\alpha$  permettant de mettre en évidence la présence de zones hypoxiques), FSP-1 (Fibroblast specific protein) et α-SMA (alpha Smooth muscle actin) (permettant de mettre en évidence la présence de fibroblastes activés). L'estimation du taux d'expression des trois marqueurs (CA9, FSP-1 et a-SMA) au niveau des coupes sériées est représentée dans la figure 1A. Les résultats obtenus montrent que parmi la cohorte de neuf patients étudiée, trois patients présentent des zones hypoxiques qui se traduisent par une forte expression de CA9 (figure 1A). Néanmoins, pour six des patients de la cohorte, aucune zone hypoxique claire n'a pu être identifiée. En effet, pour ces six patients, la présence de vaisseaux et de cellules endothéliales (également marqués par l' $\alpha$ -SMA) au niveau des coupes CA9 négatives a été détectée, expliquant sans doute l'absence de zones d'hypoxie (résultats non représentés). Néanmoins, nos résultats suggèrent la présence de fibroblastes activés au sein des zones hypoxiques identifiées pour trois patients, comme le montre la présence des marqueurs FSP-1 et α-SMA (figure 1A-B). Dans l'ensemble, ces résultats montrent donc que des fibroblastes activés peuvent être présents au niveau de zones hypoxiques présentes au sein de biopsies de mélanome métastatique. Ces données suggèrent donc que l'hypoxie au sein du microenvironnement tumoral peut potentiellement affecter les CAFs.

# 2) Isolation de fibroblastes à partir de biopsies de mélanome et caractérisation phénotypique

Afin d'étudier l'influence de l'hypoxie sur les CAFs *in vitro*, nous avons établi cinq cultures primaires de CAFs à partir de la résection tumorale de cinq différents patients atteints de mélanome métastatique (**figure 2A**). Ces CAF ont été ensuite caractérisés par cytométrie en flux afin de mesurer leur expression de différents marqueurs. Les résultats obtenus montrent que les cultures primaires de fibroblastes associés au mélanome obtenues expriment le marqueur fibroblastique FSP-1 et le marqueur mésenchymateux vimentine, mais n'expriment pas le marqueur épithélial E-cadhérine, le marqueur endothélial CD31, le marqueur hématopoïétique CD34 ou le marqueur de

leucocytes CD45 (**figure 2B**). De plus, les fibroblastes dérivés de mélanome obtenus expriment le marqueur mésenchymateux vimentine et le marqueur d'activation  $\alpha$ -SMA (**figure 2C**). Ces observations indiquent donc que les populations cellulaires que nous avons obtenues sont principalement des fibroblastes, avec une contamination minimale par des cellules épithéliales, endothéliales, hématopoïétiques ou encore par des leucocytes, et confirment leur statut d'activation.

# 3) L'hypoxie *in vitro* induit l'expression de HIF-1α et de ses cibles transcriptionnelles au niveau des CAFs

Afin d'étudier l'influence de l'hypoxie sur les CAFs *in vitro*, les fibroblastes associés au mélanome obtenus ont été placés dans une enceinte hypoxique et maintenus en culture à 1% d'O<sub>2</sub> pendant 48 hrs. La réponse à l'hypoxie par les CAFs a été ensuite vérifiée en évaluant le niveau d'expression du facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ ) par western blot. Les résultats obtenus montrent que l'ensemble de nos CAFs en conditions hypoxiques répondent à la déplétion en O<sub>2</sub> en induisant l'expression de HIF-1 $\alpha$  (**figure 3A**). De plus, cette induction de l'expression du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  s'accompagne d'une augmentation de la transcription de plusieurs de ses gènes cibles (*VEGF, CA9, SLC2A1/Glut1, PDK1*) par rapport à la condition normoxique (**figure 3B**). Ces observations montrent donc que les CAFs issus de mélanome répondent effectivement à l'hypoxie, notamment *via* l'induction du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ .

# 4) L'hypoxie augmente l'activation des CAFs et entraîne de profondes modifications de leur profil transitionnel

Les fibroblastes associés au mélanome semblent présenter une forte réponse aux conditions hypoxiques. De plus, nous avons pu observer que morphologiquement, les CAFs placés en hypoxie présentent plus de prolongements cellulaires en comparaison avec les CAFs maintenus en conditions normoxiques gardant un aspect plus fusiforme (figure 4A). De plus, des analyses en qRT-PCR ont montré que les CAFs placés en hypoxie expriment plus fortement, tout du moins dans la plupart des cas, le marqueur d'activation des fibroblastes FAP (figure 4B) ainsi que les métalloprotéinases matricielles (gélatinases) MMP2 et MMP9 (figure 4C). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'hypoxie augmente le statut d'activation des CAFs.

Afin d'étayer ces observations, nous avons réalisé un analyse du profil transcriptomique (cDNA microarrays) des CAFs placés en hypoxie que nous avons comparé avec celui des CAFs maintenus en normoxie. L'analyse des résultats a montré que 7317 gènes étaient différentiellement exprimés entre les deux conditions (hypoxie versus normoxie ; fold-change (FC)  $\ge 2$  et p value  $\le 10^{-10}$ ). De plus, l'expression de 3924 de ces gènes est augmentée alors que l'expression de 3393 de ces gènes est diminuée en hypoxie (**figure 5A**). L'analyse de l'implication de ces gènes dans différents

« pathways » (incluant l'angiogénèse, l'apoptose, la transition épithélio-mésenchymateuse...) a d'autre part permis de mettre en évidence que plusieurs de ces « pathways » étaient modifiés. Parmi ces pathways, nous avons plus précisément analysé les voies de réponse cellulaire à l'hypoxie à partir d'une liste de gènes obtenue grâce à la base de données GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Comme attendu, les CAFs placés en hypoxie sur-expriment un grand nombre de ces 649 gènes (**figure 5B**). Néanmoins, l'ensemble de ces gènes n'est pas surexprimé de manière homogène par l'ensemble de nos cinq cultures primaires de CAFs, avec notamment l'apparition de deux clusters formés par les CAFs 1-2 et les CAFs 3-5 respectivement. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'hypoxie augmente l'activation des CAFs et montrent également que l'hypoxie affecte de manière importante leur profil transcriptionnel.

# 5) L'hypoxie induit l'expression par les CAFs de gènes codant pour des protéines ayant des fonctions immuno-modulatrices

Compte tenu de notre objectif de déterminer si l'hypoxie influence les capacités immunosuppressives des CAFs au sein du microenvironnement tumoral, nous avons analysé nos résultats de transcriptomique de manière ciblée en nous focalisant sur l'expression de 167 gènes connus pour coder pour des protéines ayant des capacités immuno-modulatrices décrites dans la base de données GSEA. Les résultats obtenus montrent qu'en conditions hypoxiques, les CAFs sur-expriment un certain nombre de ces gènes, incluant IDO1, ENTPD1, ARG1, IL10, IL6, CXCL12, FASLG et LGALS3 codant respectivement pour les protéines IDO1 (Indoleamine 2,3-Dioxygénase), ENTPD1/CD39 (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1), ARG1 (Arginase 1), IL10 (Interleukine-10), IL6 (Interleukine-6), CXCL12/SDF1 (C-X-C motif chemokine 12/stromal cellderived factor 1), FasL (Fas Ligand) et Gal-3 (Galectine-3) (figure 6). Cependant, il est important de noter que l'ensemble de ces gènes n'est pas surexprimé de manière homogène par l'ensemble de nos cinq cultures primaires de CAFs hypoxiques, avec à nouveau l'apparition de deux clusters formés par les CAFs 1-2 et les CAFs 3-5 respectivement. Néanmoins, l'expression des gènes codant pour IDO1 (1 transcrit) et CD39 (2 transcrits) semble être augmentée pour l'ensemble des CAFs en hypoxie. Afin de valider ces résultats, l'expression de : IDO1, ENTPD1, ARG1, IL10, IL6, CXCL12, FASLG et LGALS3 a été testée par qRT-PCR. Les résultats obtenus confirment l'augmentation d'expression des gènes codant pour IDO1 et CD39 pour l'ensemble des CAFs en hypoxie. En ce qui concerne l'expression de ARG1, IL10, IL6, CXCL12, FASLG et LGALS3, les résultats obtenus confirment leur surexpression hétérogène par les CAFs hypoxiques, avec notamment la surexpression de ARG1, IL10 et IL6 pour les CAFs du cluster 2 (CAF3-5) alors que les CAFs du cluster 1 (CAF1-2) surexpriment majoritairement CXCL12, FASLG et LGALS3 (figure 7A). Néanmoins, il existe parfois une certaine différence entre les résultats obtenus par l'approche cDNA microarrays et par l'approche gRT-PCR (notamment pour ARG1 et CXCL12). Ainsi, nous avons également testé l'expression de CCL17 et IL19 (choisis aléatoirement) en gRT-PCR afin de servir de contrôle interne et de validation de nos résultats de génomique. L'expression de CCL17 augmentée pour les CAFs 1, 4 et 5 en hypoxie a été à la fois détectée par l'approche en cDNA microarray et qRT-PCR et l'expression de IL19 augmentée pour les CAFs 3 et 5 en hypoxie a été à la fois détectée par l'approche en cDNA microarray et qRT-PCR (figure 7B) suggérant une corrélation entre les résultats obtenus par les deux méthodes, même si certaines variations sont possibles. Finalement, nous avons également mesuré l'expression de gènes codant pour des protéines ayant des capacités immuno-modulatrices non incluses dans la liste issue de GSEA utilisée précédemment. Le niveau d'expression des gènes codant pour les protéines TGF-B1 (Tumor growth factor), TGF-B2, PD-L1 (Programmed death-ligand), PD-L2, Gal-9 (Galectine-9) et PTGS2/COX-2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase) a ainsi été testé par qRT-PCR. Les résultats obtenus montrent que l'expression des gènes codant pour TGF-β (1 ou 2) est susceptible d'être augmentée par tous les CAFs en hypoxie. De la même manière, la majorité des CAFs en hypoxie sur-expriment *PD-L1* (alors que l'expression de *PD-L2* n'est pas altérée). La majorité des CAFs en hypoxie semblent également surexprimer les gènes codant pour la Gal-9 et COX-2 (figure 8).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent donc qu'en conditions hypoxiques, les CAFs sur-expriment un certain nombre de ces gènes codant pour des protéines possédant des capacités immunosuppressives, incluant les gènes codant pour les protéines IDO1, CD39, ARG1, IL10, IL6, CXCL12/SDF1, FasL, Gal-3, Gal-9, TGF- $\beta$ , PD-L1 et COX-2, avec cependant une variabilité entre les différents CAFs.

# Discussion

Au cours de ce travail, nous avons pu montrer que des CAFs peuvent être présents au niveau de zones hypoxiques du mélanome *in vivo*. L'hypoxie peut donc potentiellement affecter les différentes propriétés des CAFs dans ce modèle tumoral. Dans ce cadre, nos résultats *in vitro* suggèrent que l'hypoxie potentialise l'état d'activation des CAFs et modifie profondément leur profil transcriptomique, notamment en induisant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress hypoxique. De plus, nos résultats montrent que l'hypoxie influence potentiellement les capacités immuno-modulatrices des CAFs en augmentant l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines ayant des capacités immunosuppressives. Cependant, l'expression de ces gènes montre une certaine hétérogénéité avec deux clusters définis (CAF1-2 et CAF3-5 respectivement). Cette hétérogénéité suggère que ces CAFs hypoxiques pourraient avoir des effets immunosuppresseurs sur des populations immunitaires différentes et par divers mécanismes indépendants, et ceci en fonction des patients. Cette hétérogénéité pourrait également être la résultante d'une origine différente de ces CAFs en fonction des patients étudiés.

Les résultats de l'analyse transcriptomique et de nos validations en qRT-PCR montrent néanmoins que parmi les gènes qui sont modulés en hypoxie, les gènes qui codent pour IDO1 et CD39 sont surexprimés au niveau de tous les CAFs. IDO1 est une enzyme permettant la dégradation du tryptophane par la voie de la kynurénine. Le métabolisme du tryptophane diminue sa disponibilité dans le microenvironnement tumoral et peut créer un environnement tolérogénique en ayant des conséquences néfastes sur la prolifération, la fonction, la survie et le phénotype des lymphocytes T environnants. En effet, ces effets immunosuppresseurs peuvent être une conséquence directe de l'activité de l'IDO1 par la disponibilité réduite du tryptophane ou être provoqués indirectement par celle-ci. Ainsi, en absence de tryptophane, les lymphocytes T peuvent s'engager dans le cycle cellulaire, mais ils sont bloqués dans la phase G1, bloquant leur prolifération. Une telle privation en tryptophane peut également provoquer une anergie lymphocytaire qui ne parviennent pas à être activés par un antigène qui leur est présenté (Munn et al., 2004). En outre, l'expression d'un gène codant pour une autre enzyme, l'arginase-1 (ARG1), est également augmentée en hypoxie par certains CAFs. L'ARG1 induit le catabolisme de la L-arginine qui est également un acide aminé important pour la prolifération des lymphocytes T (Ochoa et al., 2001).

De plus, il est important de noter que l'expression du gène qui code pour la protéine ENTPD1 (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1) ou CD39, est également augmentée au niveau de tous les CAFs en hypoxie. CD39 est une protéine transmembranaire permettant l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire circulant en adénosine diphosphate (ADP) puis en adénosine monophosphate

(AMP). L'AMP est ensuite transformée en adénosine libre par l'ecto-5'-nucleotidase (NT5E) ou CD73. L'adénosine est un régulateur des réponses immunitaires innée et adaptative et peut notamment induire une immunosuppression en altérant les activités anti-tumorales des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, des cellules NK et des DC (Allard et al., 2016).

Nos résultats montrent également que l'expression des gènes qui codent pour la galectine-9 et la galectine-3 est augmentée au niveau de certains CAFs hypoxiques. Ces galectines sont des facteurs majeurs d'immunosuppression. La Gal-9 agit sur plusieurs récepteurs membranaires, notamment le checkpoint immunitaire Tim-3 (Zhu et al., 2005) et agit comme un facteur autocrine stimulant l'expansion des lymphocytes Treg et leur activité suppressive (Wu et al., 2014). D'autre part, la Gal-3 est impliquée dans la modulation des réponses des lymphocytes T par plusieurs mécanismes, notamment par la diminution d'expression du TCR (Kouo et al., 2015). Ces donnés montrent que les galectines-9 et-3 pourraient servir de cibles thérapeutiques potentielles. Certains CAFs en conditions hypoxiques pourraient également sécréter la cyclo-oxygenase-2 (COX-2), dont le gène *PTGS2*, est augmenté de manière hétérogène par certains CAFs en hypoxie. COX-2 induit la formation d'un médiateur de l'inflammation, la prostaglandine E2 (PGE2), à partir de l'acide arachidonique, et aide ainsi à l'induction d'un environnement inflammatoire favorable au développement tumoral. De plus, nos données montrent que les gènes de cytokines telles que TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2, IL6 et IL10 sont surexprimés en hypoxie par certains CAFs, ce qui suggère qu'un microenvironnement hypoxique pourrait favoriser une production plus accrue de ces facteurs.

Finalement et de manière intéressante, l'expression du gène qui code pour le checkpoint de la réponse immune PD-L1/B7-H1 est augmenté au niveau de certains CAFs en hypoxie. PD-L1 exprimé par les CAFs pourrait être une source supplémentaire du ligand PD-L1 libéré dans le milieu extracellulaire qui par la suite peut se lier à son récepteur PD-1 exprimé à la surface des lymphocytes T et induire par conséquent l'inhibition de la fonction de ces derniers. Toutefois, aucune étude n'a, à ce jour, démontré l'expression de PD-L1 à la surface des CAFs hypoxiques. Ces données présentent ainsi de nouvelles pistes d'étude à visée thérapeutique.

L'ensemble des résultats obtenus suggère donc que l'hypoxie pourrait potentialiser les capacités immunosuppressives des CAFs, tout du moins dans le mélanome. Néanmoins des travaux complémentaires devront être menés pour étayer ces observations. En effet, il sera nécessaire par la suite de valider l'expression au niveau protéique de ces facteurs au niveau des CAFs normoxiques ou hypoxiques par différentes approches (western blot ou cytométrie en flux), ainsi que la sécrétion de ces facteurs immunosuppresseurs par des approches de dosage (ELISA ou analyse multiplexée de type Bio-Plex), ceci dans le but de corréler les résultats de l'expression génique avec leur

expression protéique. De plus, il serait important de déterminer si certains « gènes immunosuppresseurs » induits en hypoxie pourraient être des cibles directes du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , notamment en utilisant une approche de type immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) afin de démontrer la liaison de HIF-1 $\alpha$  au motif consensus HRE (élément de réponse à l'hypoxie) sur le promoteur de ces gènes au niveau des CAFs hypoxiques.

# Légendes des figures

# Figure 1: Des fibroblastes activés sont présents au niveau de zones hypoxiques de biopsies de mélanome

(A) La présence de zones hypoxiques au sein de biopsies de 9 patients a été évaluée par immunohistochimie en mesurant l'expression du marqueur CA9. Dans les zones hypoxiques CA9+ clairement identifiées, la présence de fibroblastes activés a été évaluée grâce aux marqueurs FSP1 et  $\alpha$ -SMA. L'ensemble des résultats obtenus après lecture par deux anatomo-pathologistes distincts est présenté sous forme de tableau. (+) présence ; (-) absence. (B) Images représentatives de marquage des zones hypoxiques CA9+ (marquage cytoplasmique et nucléaire), FSP1+ (marquage cytoplasmique et nucléaire) et  $\alpha$ -SMA+ (marquage cytoplasmique).

#### Figure 2: Caractérisation phénotypique des fibroblastes associés au mélanome obtenus

(A) Liste des différentes cultures primaires de CAFs obtenues. (B) Analyse de l'expression des marqueurs fibroblastiques, mésenchymateux, épithéliaux, endothéliaux, hématopoïétiques ou leucocytaires (FSP-1, Vimentine, E-cadhérine, CD31, CD34 ou CD45 respectivement) par les différentes populations fibroblastiques. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives  $\pm$  s.d. de trois expériences indépendantes par cytométrie en flux. (C) Les CAFs expriment le marqueur fibroblastique vimentine et le marqueur d'activation des fibroblastes  $\alpha$ -SMA. Les résultats présentés sont représentatifs de trois western blot indépendantes.

# Figure 3: L'hypoxie induit l'expression de HIF-1α et de certaines de ses cibles transcriptionnelles au niveau des CAFs

La réponse des fibroblastes à l'hypoxie a été vérifiée en mesurant l'induction de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et de ses gènes cibles. (A) Les fibroblastes en hypoxie (1% pO<sub>2</sub>) durant 48 hrs expriment plus de HIF-1 $\alpha$  par rapport aux fibroblastes en normoxie. Le ratio HIF-1 $\alpha$ /Actine a été calculé par densitométrie et normalisé à "0" pour les CAF1 normoxiques (A.U.: arbitrary units). (B) L'expression de gènes cibles de HIF-1 $\alpha$  (*VEGF, CA9, SLC2A1, PDK1*), testée par qRT-PCR, est augmentée au niveau des fibroblastes hypoxiques. Les résultats sont exprimés en moyenne ± s.d. de trois expériences indépendantes (N : Normoxie/ H : Hypoxie), (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01).

# Figure 4: L'hypoxie augmente l'activation des CAFs

(A) Images représentatives des CAFs en normoxie (en haut) et en hypoxie (en bas). Morphologiquement les CAF hypoxiques ont une forme très allongée et forment plus de prolongements cellulaires par rapport à la condition nomoxique. (B) L'expression du gène d'activation *FAP* testée par qRT-PCR est augmentée en hypoxie. (C) L'activation des fibroblastes en conditions hypoxiques induit une plus forte expression des gènes *MMP2* et *MMP9* qui codent pour des modulateurs de la matrice extracellulaire, les métalloprotéinases matricielles MMP2 et MMP9. Les résultats (B-C) sont exprimés en moyenne  $\pm$  s.d. de trois expériences indépendantes (N : Normoxie/ H : Hypoxie), (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; NS, Non Significatif).

#### Figure 5: L'hypoxie induit de profondes modifications du profil transcriptomique des CAFs

(A) Volcanoplot représentant les gènes différentiellement exprimés par les CAFs après 48 hrs en hypoxie en comparaison avec les conditions normoxiques. L'analyse transcriptomique a révélé la présence de 7317 gènes differenciellement exprimés entre les CAFs normoxiques et hypoxiques et parmi ces gènes, 3924 gènes sont « up-régulés » et 3393 gènes sont « down-régulés ». (B) Heatmap représentant les gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress hypoxique dont l'expression est modulée au niveau des CAFs hypoxiques.

# Figure 6: L'hypoxie induit l'expression par les CAFs de gènes qui codent pour des protéines ayant des capacités immuno-modulatrices

Une heatmap a été générée à partir des résultats de transcriptomique en ciblant une liste de 167 gènes (base de données GSEA) qui codent pour des protéines immunosupressives ou ayant des fonctions dans la modulation de la réponse immunitaire.

# Figure 7: L'hypoxie induit l'expression par les CAFs de gènes qui codent pour des protéines ayant des fonctions immunosuppressives

(A) Validation de l'expression de gènes de la heatmap (*IDO1*, *ENTPD1*, *ARG1*, *IL10*, *IL6*, *CXCL12*, *FASLG* et *LGALS3*) testée par qRT-PCR. L'expression de ces gènes est globalement augmentée au niveau des CAFs en hypoxie. (B) La mesure de l'expression de CCL17 et IL19 en qRT-PCR a servi de contrôle interne pour valider les résultats de génomique. Les résultats (A-B) sont exprimés en moyenne  $\pm$  s.d. de trois expériences indépendantes (N : Normoxie/ H : Hypoxie), (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; NS, Non Significatif).

# Figure 8: Expression par les CAFs de gènes codant pour des protéines ayant des capacités immuno-modulatrices non incluses dans la liste issue de GSEA

Le niveau d'expression des gènes *TGFB1*, *TGFB2*, *PD-L1*, *PD-L2*, *LGALS9* et *PTGS2* a été testé par qRT-PCR. Les résultats obtenus montrent que l'expression de ces gènes est globalement augmentée au niveau des CAFs en hypoxie, sauf pour le gène qui code pour PD-L2 qui ne semble
pas être altéré par l'hypoxie. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  s.d. de trois expériences indépendantes (N : Normoxie/ H : Hypoxie), (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; NS, Non Significatif).

Figure 1

Patient	Présence de zones hypoxiques (CA9+)	Présence de fibroblastes (FSP1+) dans les zones hypoxiques	Présence de fibroblastes activés (α-SMA+) dans les zones hypoxiques		
1	-				
2	-				
3	-				
4	-				
5	+	+	+		
6					
7	+	+	+		
8	+	+	+		
9	-				

CA9

FSP-1

 $\alpha$ -SMA



В

Figure 2	2
----------	---

Primary fibroblast culture	Origin	Stade
CAF1	melanoma	metastatic
CAF2	melanoma	metastatic
CAF3	melanoma	metastatic
CAF4	melanoma	metastatic
CAF5	melanoma	metastatic

Β

Α

	FSP-1	Vimentin	E-cadherin	CD31	CD34	CD45	
CAF1	93.5 +/- 2.4	73.2 +/- 9.3	2.3 +/- 0.7	3.4 +/- 0.3	2.3 +/- 0.3	2.4 +/- 0.	5
CAF2	93.6 +/- 3.3	85.8 +/- 0.6	1.5 +/- 0.4	2.9 +/- 1.2	0.5 +/- 0.3	1.0 +/- 0.2	2
CAF3	99.8 +/- 0.1	95.1 +/- 4.2	2.1 +/- 0.3	2.5 +/- 1.4	0.9 +/- 0.2	3.2 +/- 1	
CAF4	95.1 +/- 1.1	92.7 +/- 2.6	0.5 +/- 0.1	2.9 +/- 0.7	0.9 +/- 0.5	0.7 +/- 0.7	1
CAF5	96.5 +/- 1.7	95.2 +/- 4.7	2.2 +/- 1.2	2.7 +/- 0.3	0.5 +/- 0.1	1.1 +/- 0.1	1



Figure 3









N: normoxia H: hypoxia (1% O<sub>2</sub>)









N: normoxia H: hypoxia (1% O<sub>2</sub>)

hypoxia vs normoxia 10 Underexpressed: 3393 Overexpressed: 3924 -log10(Adj. P.Val.) 8 6 4 2 0 -2 -6 -4 0 2 4 6 log2(FC)

Α

В





CAF1 CAF2 CAF3 CAF4 CAF5 CAF1 CAF2 CAF3 CAF4 CAF5



Figure 6



Α

N: normoxia H: hypoxia (1% O<sub>2</sub>)

Figure 7





PD-L2









N: normoxia H: hypoxia (1% O<sub>2</sub>)



### Conclusion et

# Discussion générale

Le mélanome est un cancer exceptionnellement agressif et résistant aux traitements. Bien que beaucoup de progrès aient été réalisés au cours de la dernière décennie, notamment par des thérapies ciblées utilisant des inhibiteurs de BRAF, MEK ou KIT et le développement de l'immunothérapie à l'aide d'inhibiteurs des « checkpoints » de la réponse immunitaire, le traitement des mélanomes de stade III, IV et du mélanome récurrent reste encore un challenge en raison du taux de réponse limité et des effets secondaires sévères, ce qui souligne le besoin urgent de concevoir des approches plus efficaces pour le traitement du mélanome.

Le mélanome n'est pas seulement inhérent aux mélanocytes avec un phénotype malin, mais dépend aussi de la communication altérée entre les cellules néoplasiques et les populations de cellules non malignes, comme les cellules endothéliales et inflammatoires, et les fibroblastes dans le stroma tumoral. Ces fibroblastes associés au mélanome sont les cellules majoritaires du stroma tumoral et présentent des différences phénotypiques et physiologiques par rapport aux fibroblastes dermiques normaux. Ils acquièrent des propriétés de myofibroblastes, remodèlent la matrice extracellulaire et sécrètent des facteurs favorisant ainsi le processus de transformation en encourageant la croissance tumorale, l'angiogenèse, l'inflammation et la métastase et contribuent à la résistance aux médicaments anticancéreux. Plus spécifiquement, un certain nombre d'études in vitro et in vivo a montré que les CAFs favorisent la prolifération des cellules de mélanome. D'autre part, il est bien documenté que le mélanome est une tumeur immunogène et l'interface entre la réponse immunitaire et le mélanome représente une tentative par l'hôte pour supprimer la croissance tumorale. Les cellules NK peuvent participer à la réponse immunitaire précoce contre le mélanome et contribuer à la réponse immunitaire adaptative par la sécrétion de cytokines. Cependant, même si les cellules de mélanome sont souvent reconnues efficacement et tuées par les cellules NK in vitro, les mélanomes ont développé plusieurs stratégies élaborées pour échapper à la destruction induite par les cellules NK in vivo (Burke et al., 2010; Tarazona et al., 2015).

Nous nous sommes donc intéressés dans cette étude au rôle des CAFs au cours de la réponse immunitaire déclenchée par les effecteurs cytotoxiques NK dans le mélanome *in vitro*. Nous avons montré que les fibroblastes isolés à partir de biopsies de mélanome interfèrent avec la susceptibilité des cellules tumorales de mélanome à la lyse induite par les NK. Cet effet suppressif est en grande partie dépendant du taux élevé de MMPs actives libérées par les fibroblastes associés au mélanome et semble spécifique des fibroblastes présents dans le microenvironnement de la tumeur, les fibroblastes de peau normale n'affectant pas ou très peu la susceptibilité des cellules tumorales de mélanome à la lyse médiée par les NK. Il est maintenant bien établi que différents facteurs solubles libérés par les cellules tumorales dans le microenvironnement tumoral comme le TGF- $\beta$ , le PDGF et le FGF activent localement des fibroblastes qui acquièrent des propriétés phénotypiques et fonctionnelles différentes de leurs homologues, les fibroblastes normaux (Ohlund et al., 2014). Lorsqu'ils sont exposés à ces stimuli, les CAFs expriment des protéases telles que les MMPs, ce qui peut induire le remodelage de la matrice extracellulaire et favoriser l'invasion tumorale. En effet, les fibroblastes normaux régulent continuellement le renouvellement de la MEC dans les tissus sains en contrôlant la sécrétion des MMPs et l'expression des métalloprotéinases matricielles de type membranaire (MT-MMPs), empêchant ainsi la dégradation de la membrane basale et bloquant par conséquent un processus potentiel de métastase. Au contraire, les facteurs solubles présents dans le microenvironnement tumoral tels que TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  et FGF favorisent l'expression des MMP par les fibroblastes (Stuelten et al., 2005). De la même manière, nous avons observé dans notre étude que les fibroblastes associés au mélanome sécrètent un niveau élevé de MMP actives tandis que les fibroblastes cutanés normaux ne présentent qu'un niveau minimal de MMP dans leurs milieux conditionnés (MC).

De manière intéressante, nous avons montré que le niveau élevé d'activité des MMP dans les milieux conditionnés des CAF dérivés de mélanome est associé à la diminution de la susceptibilité des cellules tumorales de mélanome à la lyse médiée par les cellules NK, comme le montre clairement l'utilisation d'un inhibiteur de MMPs, le GM6001, qui rétablit la susceptibilité des cellules tumorales de mélanome à la lyse médiée par les NK en présence de milieux conditionnés de fibroblastes associés au mélanome. Cependant, l'inhibition de l'activité des MMP dans les milieux conditionnés des CAF après utilisation de l'inhibiteur GM6001 est très efficace mais ne rétablit que partiellement la susceptibilité des cellules tumorales de mélanome à la lyse par les NK, suggérant que les MMP ne seraient pas nécessairement les seuls facteurs impliqués dans cette diminution de lyse des cellules tumorales. De plus, nos données montrent que les fibroblastes associés au mélanome à travers la sécrétion de MMP actives, diminuent l'expression de MICA/B à la surface des cellules tumorales de mélanome, ce qui représente le mécanisme induisant cette diminution de lyse. Dans notre modèle, cet effet des CAFs dérivés de mélanome semble être spécifique à ces deux ligands des récepteurs NKG2D car l'expression des ligands ULPBs n'est pas affectée, même si nous ne pouvons pas exclure que la sécrétion des MMPs ou d'autres facteurs par les CAF pourrait influencer également l'expression d'autres ligands des récepteurs activateurs tels que CD112/ CD155, B7-H6, HLA-E qui se lient respectivement à DNAM-1, NKp30 et NKG2C. Néanmoins, étant donné que la voie NKG2D/NKG2DL est d'une importance majeure dans l'activation des cellules NK et dans leurs fonctions cytolytiques et sécrétrices de cytokines, la diminution d'expression MICA/B à la surface des cellules tumorales de mélanome dépendante des CAF et des MMPs conduit par conséquent à une forte altération de l'activité cytotoxique des cellules NK contre leurs cellules cibles de mélanome, ainsi qu'une sécrétion diminuée d'IFN-y par les cellules NK après la reconnaissance de leurs cibles. Cette sécrétion diminuée d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK pourrait d'autre part indirectement altérer la réponse dépendante des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

De plus, nous avons pu observer que ce mécanisme semble être conservé, puisque tous les CAFs isolés à partir de biopsies tumorales de patients différents atteints de mélanome ont tous le même effet sur la lyse dépendante des cellules NK. Néanmoins, d'autres études seront nécessaires pour déterminer si ce phénomène pourrait être étendu aux CAFs provenant d'autres tissus tumoraux. De plus, il est important de souligner que le récepteur NKG2D sur certaines cellules T CD8<sup>+</sup> peut déclencher un signal de co-stimulation nécessaire à leur activation (Maasho et al., 2005). La diminution de l'expression de MICA/B à la surface des cellules tumorales de mélanome pourrait donc avoir un effet délétère sur la réponse immunitaire dépendant des lymphocytes T. En ce qui concerne le mécanisme d'action des MMP sur les ligands MICA/B, quelques études ont rapporté que la sécrétion ou l'expression de ces métalloprotéinases par les cellules tumorales telles que les MMP-2, MMP-9 sécrétées et la MMP-14, peuvent conduire au clivage protéolytique (ou « shedding ») de MICA/B (Le Maux Chansac et al., 2008; Lee et al., 2008; Liu et al., 2010; Salih et al., 2006; Salih et al., 2002; Sun et al., 2011; Yamanegi et al., 2012) et éventuellement des ULBP2 et ULBP3 (Shiraishi et al., 2016) à la surface des cellules tumorales. Il est largement admis que les cellules tumorales peuvent affecter l'expression de MICA/B membranaire par la sécrétion des MMP, cependant nos résultats apportent une preuve que les cellules stromales, en l'occurrence les CAFs, peuvent également affecter l'expression des ligands MICA/B par leur sécrétion de MMPs. A travers cette étude nous apportons également un lien entre la sécrétion des MMPs par les CAF et la modulation de la réponse immune anti-tumorale induite par les cellules NK qui passe par une perturbation de la liaison entre le récepteur activateur NKG2D et ses ligands MICA/B. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour identifier les MMPs exactes impliquées dans ce processus dépendant des CAFs par l'utilisation d'inhibiteurs plus spécifiques des MMPs. Néanmoins, étant donné que MMP-14 est normalement ancré à la membrane plasmique par un domaine transmembrane et intra-cytoplasmique, il est peu probable que cette MMP soit impliquée dans le « shedding » de MICA/B à la surface des cellules tumorales traitées par des MC. De plus, le GM6001 inhibe en grande partie l'activité des MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9 et 12 sécrétées et empêche presque complètement le « shedding » de MICA/B à la surface des cellules tumorales traitées avec les MC des CAF, ce qui suggère qu'une ou plusieurs de ces MMP sont impliquées. En outre, des expériences de qRT-PCR ont montré que les CAF utilisés lors de ces travaux expriment en majorité MMP1, 2, 3 et 9 au niveau ARNm. De plus, une analyse exploratoire par spectrométrie de masse du « sécrétome » d'un échantillon de milieu conditionné de CAF nous a également permis de détecter MMP1, 2 et 3 dans les milieux conditionnés des CAFs (résultats non publiés). L'ensemble de nos données expérimentales et les données de la littérature nous laisse donc supposer à l'heure actuelle que MMP2 en particulier pourrait être impliquée dans le « shedding » de MICA/B à la surface des cellules tumorales induit par les CAFs. L'ensemble des nos données expérimentales nous a également permis de proposer le modèle représenté dans la figure ci-dessous.



Figure 31: Schéma illustrant le mécanisme d'action des CAFs altérant la sensibilité des cellules tumorales à la lyse induite par les cellules NK. Au sein du microenvironnement tumoral, les CAFs sécrètent de fortes quantités de MMPs actives. Ces MMPs, par un mécansime de « shedding », induisent une diminution d'expression de ligands de NKG2D, à savoir MICA/B, à la surface des cellules tumorales et par conséquent altèrent leur lyse par les cellules NK. Ce phénomène altère également la production de cytokine (IFN- $\gamma$ ) par les NK lors de leur interaction avec les cellules tumorales.

Enfin, il est important de souligner qu'une étude pionnière impliquant des CAF isolés de mélanome, mais aussi d'autres études impliquant des fibroblastes dérivés de carcinome hépatocellulaire et colorectal, ont montré que ces cellules peuvent diminuer l'expression de NKp30, NKp44, DNAM-1 et/ou NKG2D à la surface des cellules NK, ainsi que l'expression PFN ou GzmB (Balsamo et al., 2009; Li et al., 2012; Li et al., 2013). Ces effets semblent dépendre, du moins en partie, de la sécrétion de PGE2 et d'IDO par les CAF et conduire à une atténuation de l'activité cytotoxique des cellules NK contre leurs cellules cibles tumorales. Dans ce contexte, ces études et nos résultats mettent en évidence que le sécrétome des CAF, en particulier dans le mélanome, modifie de manière importante la réponse immunitaire anti-tumorale dépendante des NK par différents mécanismes, notamment par la sécrétion de MMP actives. D'autres études seront donc nécessaires pour déterminer si l'utilisation d'inhibiteurs de MMPs (Vandenbroucke and Libert, 2014), seuls ou en combinaison avec des inhibiteurs de PGE2 ou d'IDO, pourrait améliorer le contrôle de la croissance tumorale dépendant des NK dans des modèles précliniques. De plus, des travaux seraient également nécessaires afin de déterminer si ces inhibiteurs de MMPs pourraient être utilisés en combinaison avec les traitements contre le mélanome basés sur l'immunothérapie.

Il est d'autre part probable que les fibroblastes associés au cancer au niveau du stroma sont infiltrés dans un environnement tumoral hypoxique. Nous nous sommes donc intéressés à l'hypoxie qui est une composante intégrale et tout aussi importante du stroma des tumeurs solides et peut influencer différentes populations du MET et plusieurs paramètres biologiques conduisant au potentiel malin (Semenza, 2012b). En effet, les tumeurs solides créent un microenvironnement hypoxique hostile qui peut entraver l'efficacité de la réponse immunitaire. Nous avons cherché à comprendre l'influence de cette composante métabolique et de « mimer » un microenvironnement tumoral dans lequel se trouvent les CAFs. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur l'effet de l'hypoxie sur les capacités immuno-modulatrices des fibroblastes associés au mélanome. Nos résultats montrent que les CAFs placés en conditions hypoxiques répondent à ce stress en exprimant le facteur induit par l'hypoxie HIF-1α ainsi que plusieurs de ses gènes cibles. En outre, une approche expérimentale de type « Gene Expression » (cDNA microarray) nous a permis d'identifier des gènes codant pour des protéines connues pour avoir des propriétés immuno-modulatrices dont l'expression est modulée par l'hypoxie au sein des fibroblastes associés au mélanome. En effet, nous avons observé que l'hypoxie (1% pO<sub>2</sub>) augmente l'expression dans les CAFs d'un certain nombre de gènes codant pour des facteurs immunosuppresseurs bien connus dans la littérature (IDO1, CD39, IL10, ARG1, IL6, FasL, Gal-3 et -9, TGF-\beta1...). Néanmoins, ces augmentations d'expression semblent être hétérogènes entre les CAFs isolés de cinq différents patients, ce qui suggère que ces CAFs pourraient avoir des rôles différents dans l'induction d'une immunosuppression au niveau du microenvironnement tumoral, agir sur des populations immunitaires différentes et cela par divers mécanismes. De plus, cette hétérogénéité pourrait être la résultante d'une origine différente de ces CAFs en fonction des patients étudiés et des traitements préalables. Néanmoins l'expression d'IDO1 et de CD39/ENTPD1 semble être augmentée pour l'ensemble des CAFs en hypoxie. De manière intéressante, CD39 représente une cible thérapeutique nouvelle et prometteuse en oncologie. En effet, des expériences in vitro et in vivo impliquant des modèles de knock-out de CD39 apportent des preuves de l'activité anticancéreuse de l'inhibition de CD39. En outre, le développement d'anticorps monoclonaux bloquant CD39 comme médicaments anticancéreux potentiels pourrait représenter de nouveaux outils thérapeutiques pour inhiber sélectivement la fonction des Treg du fait de leur expression de CD39 (Bastid et al., 2013).

L'ensemble des résultats obtenus a ainsi permis de définir clairement une signature immunosuppressive des CAFs hypoxiques. Néanmoins des travaux complémentaires devront être menés pour étayer ces observations. En effet, il sera nécessaire par la suite de valider l'expression de ces facteurs au niveau des CAFs normoxiques ou hypoxiques ainsi que la sécrétion de ces facteurs immunosuppresseurs par différentes approches pour corroborer les résultats obtenus par l'analyse de leur transcriptome. Il serait également intéressant et nécessaire de renforcer cette étude en validant les effets biologiques de l'hypoxie sur l'immunosuppression contrôlée par les CAFs en comparant ces effets à ceux des CAFs normoxiques.

En particulier, étant donné que les CAFs hypoxiques expriment de manière plus importante des facteurs qui inhibent l'activation des CTL (IDO1, ARG1, CD39), il serait intéressant de définir si les milieux conditionnés de ces CAFs pourraient altérer la prolifération de PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) et les fonctions des lymphocytes T cytotoxiques. De la même manière, la sécrétion de prostaglandines, d'IL-6 et de VEGF pourrait augmenter la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs par les cellules myéloïdes immunosuppressives en ciblant la voie de signalisation associant les protéines JAK (Janus kinase) qui convergent vers l'activation du facteur de transcription STAT3 (Ugel et al., 2009).

La forte sécrétion de VEGF par les CAFs hypoxiques pourrait également altérer la maturation et la fonctionnalité des cellules dendritiques (Ohm et al., 2003). Enfin, les CAFs hypoxiques pourraient jouer un rôle important dans la polarisation des macrophages associés aux tumeurs comme le suggère l'expression augmentée d'IL10 et de TGF- $\beta$  qui peuvent favoriser la polarisation en macrophage de type II (Murray et al., 2014). Plus globalement, il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de l'hypoxie sur les capacités pro-tumorales des CAFs hypoxiques en les co-cultivant avec des cellules tumorales ou en traitant les cellules tumorales directement avec les milieux conditionnés des CAFs hypoxiques afin d'étudier leur effet sur par exemple l'invasion des cellules tumorales et la formation de métastases étant donné que l'expression des MMPs au niveau des CAFs hypoxiques est augmentée.

## Perspectives

Lors de l'évolution des cellules tumorales, l'environnement est crucial pour leur survie, leur croissance et leur progression. A ce titre le microenvironnement tumoral est devenu une cible privilégiée pour étudier de nouvelles approches pour le traitement des cancers. De plus, les stratégies immunothérapeutiques visant à déclencher ou à améliorer l'immunité anti-tumorale sont décevantes en raison de la diversité des mécanismes d'échappement tumoral à l'immunosurveillance. Par ailleurs, une thérapie combinant le ciblage des cellules tumorales et des différentes composantes du stroma peut fournir des stratégies pour améliorer les résultats thérapeutiques et surmonter la résistance aux traitements. Il devient alors important d'étudier ces différents éléments et leurs implications dans la survie et le développement de la tumeur pour essayer de les cibler.

### Cibler les fibroblastes associés au cancer et leur sécrétome

Les options de traitement pour les patients atteints de mélanome métastatique ont considérablement augmenté ces dernières années (Bertolotto, 2013). Ainsi, une meilleure compréhension de l'influence du microenvironnement tumoral permettra de concevoir des approches thérapeutiques nouvelles et efficaces. Le plus grand avantage de cibler les CAF repose sur le fait que cela pourrait être appliqué à des patients porteurs de mutations génétiques différentes et aider à surmonter la résistance aux médicaments due à l'hétérogénéité du mélanome et à l'instabilité génomique. Bien que des progrès passionnants aient été réalisés dans la compréhension des CAF et de leurs interactions réciproques avec les cellules de mélanome, les mécanismes sous-jacents de ces interactions demeurent insaisissables. La connaissance de ces mécanismes avancera certainement notre compréhension de la biologie du mélanome pour concevoir de meilleures stratégies thérapeutiques pour cette maladie mortelle et sans doute pour d'autres cancers. Cibler les CAF pour traiter le mélanome représente une prouesse dans le traitement de cette maladie. En effet, comme il a été mentionné précédemment, les CAF jouant un rôle important dans le développement des tumeurs et étant plus génétiquement stables que les cellules tumorales, les CAF apparaissent comme une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement du mélanome (Loeffler et al., 2006).

En combinant la connaissance des marqueurs de cellules stromales et de l'hétérogénéité d'origine des CAFs qui résulte en l'expression de marqueurs différents, avec les progrès récents des thérapies anti-cancéreuses basées sur le stroma, le concept de thérapie personnalisée pourrait également être étendue au microenvironnement de la tumeur, fournissant ainsi une façon plus complète de traiter le cancer. Ainsi, les CAF qui expriment la protéine FAP dans les tumeurs solides, représentent des cibles thérapeutiques intéressantes. Pour cibler les CAFs expriment FAP dans le stroma associé aux

tumeurs, une équipe a modifié génétiquement des lymphocytes T pour exprimer un récepteur d'antigène chimérique spécifique à la protéine FAP (CAR, chimeric antigen receptor). Les lymphocytes T spécifiques de FAP résultants reconnaissent et tuent des cellules cibles positives pour la protéine FAP en libérant des cytokines pro-inflammatoires et en induisant la lyse des cellules cibles. De plus, dans un modèle de cancer du poumon, le transfert adoptif de cellules T spécifiques de FAP a significativement réduit le nombre de cellules stromales qui expriment la protéine FAP (Kakarla et al., 2013). Néanmoins, l'expression de FAP au niveau des fibroblastes associés au mélanome étant toujours sujet à controverse et sans doute faible, le ciblage de ce marqueur n'est sans doute pas une bonne piste thérapeutique dans cette pathologie, ce qui met également en lumière la nécessité d'identifier et de cibler d'autres marqueurs des CAFs dans le mélanome.

De plus, la combinaison des traitements actuels d'immunothérapie et des molécules inhibitrices de facteurs sécrétés par les CAF serait une approche intéressante dans le traitement des cancers résistants à l'immunothérapie seule. En effet, un modèle d'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDA) a permis d'analyser l'inefficacité de l'immunothérapie dans cette maladie. Malgré le fait que des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques des cellules cancéreuses sont présentes chez les souris porteuses de cellules PDA, les souris, comme les patients atteints de PDA, ne répondent pas aux anti-CTLA-4 et aux anti-PD-L1. En revanche, l'administration de la molécule AMD3100 qui est un inhibiteur du récepteur CXCR4 de la chimiokine CXCL12 majorotairement sécrétée par les CAFs, induit une accumulation rapide de lymphocytes T parmi les cellules cancéreuses et agit en synergie avec les anti-PD-L1 pour diminuer fortement la croissance tumorale (Feig et al., 2013). Il serait donc intéressant de cibler les facteurs sécrétés par les CAFs (comme par exemple le TGF- $\beta$ 1) et leurs récepteurs qui sont impliqués dans le développement tumoral par des inhibiteurs tels que le sunitinib (PDGFR, VEGFR, KIT and FLT-3) ou le sorafenib (PDGFR, VEGFR, c-Raf-1, B-raf).

Il serait également pertinent de cibler les métalloprotéinases matricelles sécrétées par les CAFs, notamment sur la base de notre étude qui montre l'effet néfaste des MMPs sécrétées par les CAFs sur la modulation de la réponse NK et sur la base d'autres travaux montrant que les MMPs promeuvent un environnement tumoral immunosuppressif (notamment par l'activation protéolytique du TGF- $\beta$  (Yu and Stamenkovic, 2000) et la dégradation du récepteur de l'IL-2- $\beta$  entraînant l'inhibition de la prolifération des cellules T intra-tumorales (Egeblad and Werb, 2002)). Le blocage de la synthèse des MMPs ou de leur activité pourrait contrecarrer ces effets et avoir le potentiel d'améliorer l'immunothérapie pour le cancer. En outre, le fait que dans de nombreux cancers, les MMP sont produites par les cellules du stroma plutôt que par les cellules tumorales suggère que l'inhibition des MMP pourrait échapper au développement de résistances principalement dues à

l'instabilité génétique des cellules tumorales. Différentes approches ont ainsi été développées pour interférer avec l'expression ou l'activation des MMP. La méthode principale réside dans l'emploi d'inhibiteurs synthétiques qui interagissent directement avec le site catalytique des MMP pour bloquer de façon réversible leur activité protéolytique et plusieurs molécules ayant une grande affinité pour les MMP ont été synthétisées. Les impressionnantes données précliniques en oncologie ont alimenté le développement clinique de plusieurs inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles et la combinaison de ces inhibiteurs et de l'immunothérapie anti-cancéreuse pourrait représenter une bonne piste d'exploration.

En conclusion, l'exploitation de ces fibroblastes associés au cancer et des nouvelles connaissances sont d'un intérêt majeur pour une meilleure intervention dans le domaine d'immunité anti-tumorale dans divers cancers.

### Intervenir sur les propriétés hypoxiques pour améliorer les approches d'immunothérapie

L'immunothérapie des tumeurs dans la clinique ne tient pas compte du microenvironnement hypoxique et de son impact sur le résultat thérapeutique bien qu'il existe des médicaments anticancéreux inhibant HIF (Scholz and Taylor, 2013; Semenza, 2009, 2012b). Il est évident que, compte tenu de l'importance de l'hypoxie dans la régulation de la progression tumorale et la suppression de la réponse immunitaire, intervenir sur les propriétés hypoxiques des tumeurs pourrait être une approche considérable dans les nouvelles thérapies combinées anticancéreuses. À cet égard, le changement des propriétés de cette composante métabolique pourrait dans notre cas diminuer l'activation des fibroblastes et par conséquent, leur taux de sécrétion de facteurs solubles comme les MMPs ou les facteurs qui ont un rôle dans l'immunossupression et donc améliorer la réponse anti-tumorale. Cette intervention pourrait également diminuer le nombre de cellules immunosuppressives et inhiber leurs fonctions, augmenter le nombre des cellules T effectrices et améliorer l'efficacité des vaccins, par conséquent, améliorer l'immunothérapie anti-tumorale. Agir sur le microenvironnement tumoral hypoxique pour stimuler les cellules immunitaires est donc très pertinent. Plusieurs éléments de la voie de réponse à l'hypoxie sont de bons candidats pour le ciblage thérapeutique notamment HIF-1 $\alpha$ , cependant l'exploitation des voies de signalisation d'hypoxie pour l'application clinique, en particulier dans les tumeurs solides, est difficile. Dans ce contexte, le remodelage du microenvironnement tumoral grâce à la normalisation vasculaire pour éviter la résistance de la tumeur et la suppression immunitaire pourrait également offrir des approches thérapeutiques innovantes. Il sera donc important de prendre en compte la manipulation du stress hypoxique dans les futures thérapies des cancers pour faciliter et améliorer l'efficacité immunothérapeutique qui finiront par être bénéfiques chez les patients cancéreux.

## Bibliographie

Abbenante, G., and Fairlie, D.P. (2005). Protease inhibitors in the clinic. Med Chem 1, 71-104.

Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P.G., Manova-Todorova, K., Leversha, M., Hogg, N., Seshan, V.E., et al. (2012). A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. Cell 150, 165-178.

Agarwala, S.S. (2009). Current systemic therapy for metastatic melanoma. Expert Rev Anticancer Ther 9, 587-595.

Agarwala, S.S., and O'Day, S.J. (2011). Current and future adjuvant immunotherapies for melanoma: blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 as a novel approach. Cancer Treat Rev 37, 133-142.

Albrengues, J., Bertero, T., Grasset, E., Bonan, S., Maiel, M., Bourget, I., Philippe, C., Herraiz Serrano, C., Benamar, S., Croce, O., et al. (2015). Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. Nature communications 6, 10204.

Albrengues, J., Bourget, I., Pons, C., Butet, V., Hofman, P., Tartare-Deckert, S., Feral, C.C., Meneguzzi, G., and Gaggioli, C. (2014). LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. Cell Rep 7, 1664-1678.

Allard, B., Beavis, P.A., Darcy, P.K., and Stagg, J. (2016). Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. Current opinion in pharmacology 29, 7-16.

Allen, M., and Louise Jones, J. (2011). Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. J Pathol 223, 162-176.

Allinen, M., Beroukhim, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., et al. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. Cancer Cell 6, 17-32.

Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. J Immunol 166, 678-689.

Ambartsumian, N.S., Grigorian, M.S., Larsen, I.F., Karlstrom, O., Sidenius, N., Rygaard, J., Georgiev, G., and Lukanidin, E. (1996). Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. Oncogene 13, 1621-1630.

Ancuta, P., Autissier, P., Wurcel, A., Zaman, T., Stone, D., and Gabuzda, D. (2006). CD16+ monocyte-derived macrophages activate resting T cells for HIV infection by producing CCR3 and CCR4 ligands. J Immunol 176, 5760-5771.

Andarawewa, K.L., Motrescu, E.R., Chenard, M.P., Gansmuller, A., Stoll, I., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (2005). Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front. Cancer research 65, 10862-10871.

Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Breso, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., et al. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. Immunity 25, 331-342.

Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T.N., Thomas, V.K., Dustin, M.L., and Sykulev, Y. (2005). Distinct role of lymphocyte functionassociated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 6437-6442.

Anthony, D.A., Andrews, D.M., Watt, S.V., Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2010). Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. Immunol Rev 235, 73-92.

Arkenau, H.T., Kefford, R., and Long, G.V. (2011). Targeting BRAF for patients with melanoma. Br J Cancer 104, 392-398.

Armstrong, T., Packham, G., Murphy, L.B., Bateman, A.C., Conti, J.A., Fine, D.R., Johnson, C.D., Benyon, R.C., and Iredale, J.P. (2004). Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res 10, 7427-7437.

Ashiru, O., Boutet, P., Fernandez-Messina, L., Aguera-Gonzalez, S., Skepper, J.N., Vales-Gomez, M., and Reyburn, H.T. (2010). Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA\*008 that is shed by tumor cells in exosomes. Cancer research 70, 481-489.

Ashkenazi, A., and Salvesen, G. (2014). Regulated cell death: signaling and mechanisms. Annu Rev Cell Dev Biol 30, 337-356.

Augsten, M. (2014). Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. Front Oncol 4, 62.

Augsten, M., Hagglof, C., Olsson, E., Stolz, C., Tsagozis, P., Levchenko, T., Frederick, M.J., Borg, A., Micke, P., Egevad, L., and Ostman, A. (2009). CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 3414-3419.

Avgustinova, A., Iravani, M., Robertson, D., Fearns, A., Gao, Q., Klingbeil, P., Hanby, A.M., Speirs, V., Sahai, E., Calvo, F., and Isacke, C.M. (2016). Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. Nature communications 7, 10305.

Bacon, L., Eagle, R.A., Meyer, M., Easom, N., Young, N.T., and Trowsdale, J. (2004). Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. J Immunol 173, 1078-1084.

Baginska, J., Viry, E., Berchem, G., Poli, A., Noman, M.Z., van Moer, K., Medves, S., Zimmer, J., Oudin, A., Niclou, S.P., et al. (2013). Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 17450-17455.

Bailey, S.R., Nelson, M.H., Himes, R.A., Li, Z., Mehrotra, S., and Paulos, C.M. (2014). Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. Frontiers in immunology 5, 276.

Bajetta, E., Del Vecchio, M., Bernard-Marty, C., Vitali, M., Buzzoni, R., Rixe, O., Nova, P., Aglione, S., Taillibert, S., and Khayat, D. (2002). Metastatic melanoma: chemotherapy. Semin Oncol 29, 427-445.

Balch, C.M., Soong, S.J., Gershenwald, J.E., Thompson, J.F., Reintgen, D.S., Cascinelli, N., Urist, M., McMasters, K.M., Ross, M.I., Kirkwood, J.M., et al. (2001). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol 19, 3622-3634.

Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 357, 539-545.

Balsamo, M., Manzini, C., Pietra, G., Raggi, F., Blengio, F., Mingari, M.C., Varesio, L., Moretta, L., Bosco, M.C., and Vitale, M. (2013). Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC. Eur J Immunol 43, 2756-2764.

Balsamo, M., Scordamaglia, F., Pietra, G., Manzini, C., Cantoni, C., Boitano, M., Queirolo, P., Vermi, W., Facchetti, F., Moretta, A., et al. (2009). Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 20847-20852.

Bambard, N.D., Mathew, S.O., and Mathew, P.A. (2010). LLT1-mediated activation of IFN-gamma production in human natural killer cells involves ERK signalling pathway. Scand J Immunol 71, 210-219.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392, 245-252.

Bandyopadhyay, R.S., Phelan, M., and Faller, D.V. (1995). Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. Biochim Biophys Acta 1264, 72-78.

Barone, I., Catalano, S., Gelsomino, L., Marsico, S., Giordano, C., Panza, S., Bonofiglio, D., Bossi, G., Covington, K.R., Fuqua, S.A., and Ando, S. (2012). Leptin mediates tumor-stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells. Cancer research 72, 1416-1427.

Barrow, J.C., Nantermet, P.G., Stauffer, S.R., Ngo, P.L., Steinbeiser, M.A., Mao, S.S., Carroll, S.S., Bailey, C., Colussi, D., Bosserman, M., et al. (2003). Synthesis and evaluation of imidazole acetic acid inhibitors of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor as novel antithrombotics. J Med Chem 46, 5294-5297.

Barsoum, I.B., Smallwood, C.A., Siemens, D.R., and Graham, C.H. (2014). A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. Cancer research 74, 665-674.

Bastid, J., Cottalorda-Regairaz, A., Alberici, G., Bonnefoy, N., Eliaou, J.F., and Bensussan, A. (2013). ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. Oncogene 32, 1743-1751.

Baudhuin, J., Lesport, E., Sousa, S., Migraine, J., Vigneron, J., Lemaoult, J., Carosella, E.D., Mooney, N., and Favier, B. (2012). HLA-G inhibition of NK-cell cytolytic function is uncoupled from tumor cell lipid raft reorganization. Eur J Immunol 42, 700-709.

Bedikian, A.Y., Millward, M., Pehamberger, H., Conry, R., Gore, M., Trefzer, U., Pavlick, A.C., DeConti, R., Hersh, E.M., Hersey, P., et al. (2006). Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. J Clin Oncol 24, 4738-4745.

Bedogni, B., and Powell, M.B. (2009). Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. Pigment Cell Melanoma Res 22, 166-174.

Beitner-Johnson, D., and Millhorn, D.E. (1998). Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism. The Journal of biological chemistry 273, 19834-19839.

Ben Safta, T., Ziani, L., Favre, L., Lamendour, L., Gros, G., Mami-Chouaib, F., Martinvalet, D., Chouaib, S., and Thiery, J. (2015). Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. J Immunol 194, 418-428.

Benard, J. (2004). [Microenvironment and tumor progression: the progress concept]. Bull Cancer 91, 663-665.

Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., and Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat Cell Biol 2, 737-744.

Bertolotto, C. (2013). Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. Scientifica (Cairo) 2013, 635203.

Bertout, J.A., Patel, S.A., and Simon, M.C. (2008). The impact of O2 availability on human cancer. Nature reviews. Cancer 8, 967-975.

Bertrand, A., Kostine, M., Barnetche, T., Truchetet, M.E., and Schaeverbeke, T. (2015). Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. BMC Med 13, 211.

Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. Science 303, 848-851.

Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C., and Moretta, A. (2001). Human natural killer cell receptors and co-receptors. Immunol Rev 181, 203-214.

Bicknell, D.C., Rowan, A., and Bodmer, W.F. (1994). Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 4751-4755.

Bladergroen, B.A., Meijer, C.J., ten Berge, R.L., Hack, C.E., Muris, J.J., Dukers, D.F., Chott, A., Kazama, Y., Oudejans, J.J., van Berkum, O., and Kummer, J.A. (2002). Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? Blood 99, 232-237.

Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., and Kuliopulos, A. (2005). PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. Cell 120, 303-313.

Boon, T., Coulie, P.G., and Van den Eynde, B. (1997). Tumor antigens recognized by T cells. Immunol Today 18, 267-268.

Boon, T., and Lucas, S. (1996). [Rejection antigens of tumors and specific immunotherapy of cancer]. Bull Mem Acad R Med Belg 151, 469-479.

Borges, F.T., Melo, S.A., Ozdemir, B.C., Kato, N., Revuelta, I., Miller, C.A., Gattone, V.H., 2nd, LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2013). TGF-beta1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. J Am Soc Nephrol 24, 385-392.

Borrego, F., Kabat, J., Kim, D.K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J.E. (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. Mol Immunol 38, 637-660.

Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G.M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. Immunol Rev 189, 152-160.

Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., et al. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. The Journal of experimental medicine 198, 557-567.

Boutet, P., Aguera-Gonzalez, S., Atkinson, S., Pennington, C.J., Edwards, D.R., Murphy, G., Reyburn, H.T., and Vales-Gomez, M. (2009). Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. J Immunol 182, 49-53.

Bovenschen, N., and Kummer, J.A. (2010). Orphan granzymes find a home. Immunol Rev 235, 117-127.

Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. J Mol Med (Berl) 85, 1301-1307.

Brahmer, J.R., Drake, C.G., Wollner, I., Powderly, J.D., Picus, J., Sharfman, W.H., Stankevich, E., Pons, A., Salay, T.M., McMiller, T.L., et al. (2010). Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. J Clin Oncol 28, 3167-3175.

Brat, D.J., and Mapstone, T.B. (2003). Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. Ann Intern Med 138, 659-668.

Brundula, V., Rewcastle, N.B., Metz, L.M., Bernard, C.C., and Yong, V.W. (2002). Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. Brain 125, 1297-1308.

Bruzzese, F., Hagglof, C., Leone, A., Sjoberg, E., Roca, M.S., Kiflemariam, S., Sjoblom, T., Hammarsten, P., Egevad, L., Bergh, A., et al. (2014). Local and systemic protumorigenic effects of cancer-associated fibroblast-derived GDF15. Cancer research 74, 3408-3417.

Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., and Long, E.O. (2006). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. Immunol Rev 214, 73-91.

Buganim, Y., Madar, S., Rais, Y., Pomeraniec, L., Harel, E., Solomon, H., Kalo, E., Goldstein, I., Brosh, R., Haimov, O., et al. (2011). Transcriptional activity of ATF3 in the stromal compartment of tumors promotes cancer progression. Carcinogenesis 32, 1749-1757.

Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K.P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L., and Lewis, C.E. (2003). Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. Am J Pathol 163, 1233-1243.

Burke, S., Lakshmikanth, T., Colucci, F., and Carbone, E. (2010). New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. Trends Immunol 31, 339-345.

Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. Prog Exp Tumor Res 13, 1-27.

Caligiuri, M.A. (2008). Human natural killer cells. Blood 112, 461-469.

Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V., Iglesias, M., Cespedes, M.V., Sevillano, M., Nadal, C., Jung, P., Zhang, X.H., et al. (2012). Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. Cancer Cell 22, 571-584.

Campbell, I., Polyak, K., and Haviv, I. (2009). Clonal mutations in the cancer-associated fibroblasts: the case against genetic coevolution. Cancer research 69, 6765-6768; discussion 6769.

Camps, J.L., Chang, S.M., Hsu, T.C., Freeman, M.R., Hong, S.J., Zhau, H.E., von Eschenbach, A.C., and Chung, L.W. (1990). Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 75-79.

Carbognin, L., Pilotto, S., Milella, M., Vaccaro, V., Brunelli, M., Calio, A., Cuppone, F., Sperduti, I., Giannarelli, D., Chilosi, M., et al. (2015). Differential Activity of Nivolumab, Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1): Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma, Lung and Genitourinary Cancers. PloS one 10, e0130142.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. Nat Med 9, 653-660.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 407, 249-257.

Carrega, P., Pezzino, G., Queirolo, P., Bonaccorsi, I., Falco, M., Vita, G., Pende, D., Misefari, A., Moretta, A., Mingari, M.C., et al. (2009). Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells. PloS one 4, e8132.

Carroll, V.A., and Ashcroft, M. (2005). Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. Expert Rev Mol Med 7, 1-16.

Casado, J.G., Pawelec, G., Morgado, S., Sanchez-Correa, B., Delgado, E., Gayoso, I., Duran, E., Solana, R., and Tarazona, R. (2009). Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. Cancer Immunol Immunother 58, 1517-1526.

Castellsague, X., Bosch, F.X., and Munoz, N. (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. Virus Res 89, 191-199.

Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigenpresenting cells. Eur J Immunol 30, 1538-1543.

Cerwenka, A., Bakker, A.B., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2000). Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. Immunity 12, 721-727.

Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. Science 331, 1559-1564.

Chaix, J., Tessmer, M.S., Hoebe, K., Fuseri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E., and Walzer, T. (2008). Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. J Immunol 181, 1627-1631.

Chalupny, N.J., Sutherland, C.L., Lawrence, W.A., Rein-Weston, A., and Cosman, D. (2003). ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. Biochem Biophys Res Commun 305, 129-135.

Champagne, P., Ogg, G.S., King, A.S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G.P., Fleury, S., Lipp, M., et al. (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. Nature 410, 106-111.

Chang, C., Rodriguez, A., Carretero, M., Lopez-Botet, M., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1995). Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. Eur J Immunol 25, 2433-2437.

Chang, H.Y., Chi, J.T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., and Brown, P.O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 12877-12882.

Chang, J.T., and Mani, S.A. (2013). Sheep, wolf, or werewolf: cancer stem cells and the epithelial-to-mesenchymal transition. Cancer Lett 341, 16-23.

Chang, S.H., Worley, L.A., Onken, M.D., and Harbour, J.W. (2008). Prognostic biomarkers in uveal melanoma: evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis. Melanoma Res 18, 191-200.

Chaturvedi, P., Gilkes, D.M., Takano, N., and Semenza, G.L. (2014). Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triplenegative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, E2120-2129.

Chaudhri, V.K., Salzler, G.G., Dick, S.A., Buckman, M.S., Sordella, R., Karoly, E.D., Mohney, R., Stiles, B.M., Elemento, O., Altorki, N.K., and McGraw, T.E. (2013). Metabolic alterations in lung cancer-associated fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of the tumor. Mol Cancer Res 11, 579-592.

Cheli, Y., Giuliano, S., Fenouille, N., Allegra, M., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Lacour, J.P., Tartare-Deckert, S., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2012). Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. Oncogene 31, 2461-2470.

Chen, W., Frank, M.E., Jin, W., and Wahl, S.M. (2001). TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. Immunity 14, 715-725.

Cheng, J.D., Dunbrack, R.L., Jr., Valianou, M., Rogatko, A., Alpaugh, R.K., and Weiner, L.M. (2002). Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model. Cancer research 62, 4767-4772.

Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R., and Tian, Z. (2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. Cell Mol Immunol 10, 230-252.

Chester, C., Fritsch, K., and Kohrt, H.E. (2015). Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Costimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. Frontiers in immunology 6, 601.

Chiesa, S., Mingueneau, M., Fuseri, N., Malissen, B., Raulet, D.H., Malissen, M., Vivier, E., and Tomasello, E. (2006). Multiplicity and plasticity of natural killer cell signaling pathways. Blood 107, 2364-2372.

Chitadze, G., Lettau, M., Bhat, J., Wesch, D., Steinle, A., Furst, D., Mytilineos, J., Kalthoff, H., Janssen, O., Oberg, H.H., and Kabelitz, D. (2013). Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the "a disintegrin and metalloproteases" 10 and 17. Int J Cancer 133, 1557-1566.

Choi, M.R., Stanton-Maxey, K.J., Stanley, J.K., Levin, C.S., Bardhan, R., Akin, D., Badve, S., Sturgis, J., Robinson, J.P., Bashir, R., et al. (2007). A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. Nano Lett 7, 3759-3765.

Chowdhury, D., and Lieberman, J. (2008). Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. Annu Rev Immunol 26, 389-420.

Chretien, A.S., Le Roy, A., Vey, N., Prebet, T., Blaise, D., Fauriat, C., and Olive, D. (2014). Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity. Frontiers in immunology 5, 122.

Chun, Y.S., Yeo, E.J., Choi, E., Teng, C.M., Bae, J.M., Kim, M.S., and Park, J.W. (2001). Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells. Biochemical pharmacology 61, 947-954.

Cirri, P., and Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. Am J Cancer Res 1, 482-497.

Cole, K.E., Strick, C.A., Paradis, T.J., Ogborne, K.T., Loetscher, M., Gladue, R.P., Lin, W., Boyd, J.G., Moser, B., Wood, D.E., et al. (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. The Journal of experimental medicine 187, 2009-2021.

Comito, G., Giannoni, E., Segura, C.P., Barcellos-de-Souza, P., Raspollini, M.R., Baroni, G., Lanciotti, M., Serni, S., and Chiarugi, P. (2014). Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. Oncogene 33, 2423-2431.

Conti, J.A., Kendall, T.J., Bateman, A., Armstrong, T.A., Papa-Adams, A., Xu, Q., Packham, G., Primrose, J.N., Benyon, R.C., and Iredale, J.P. (2008). The desmoplastic reaction surrounding hepatic colorectal adenocarcinoma metastases aids tumor growth and survival via alphav integrin ligation. Clin Cancer Res 14, 6405-6413.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol 22, 633-640.

Correia, A.L., and Bissell, M.J. (2012). The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. Drug Resist Updat 15, 39-49.

Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.I., Cheng, P., Cho, H.I., Celis, E., Quiceno, D.G., Padhya, T., et al. (2010). HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. The Journal of experimental medicine 207, 2439-2453.

Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. Immunity 14, 123-133.

Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science 295, 2387-2392.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. Nature 420, 860-867.

Crane, C.A., Han, S.J., Barry, J.J., Ahn, B.J., Lanier, L.L., and Parsa, A.T. (2010). TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. Neuro Oncol 12, 7-13.

Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., Kaminker, J., and Ferrara, N. (2009). PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. Cancer Cell 15, 21-34.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. Cell Stem Cell 3, 301-313.

Cromme, F.V., Airey, J., Heemels, M.T., Ploegh, H.L., Keating, P.J., Stern, P.L., Meijer, C.J., and Walboomers, J.M. (1994). Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. The Journal of experimental medicine 179, 335-340.

da Silva, G.B., Silva, T.G., Duarte, R.A., Neto, N.L., Carrara, H.H., Donadi, E.A., Goncalves, M.A., Soares, E.G., and Soares, C.P. (2013). Expression of the Classical and Nonclassical HLA Molecules in Breast Cancer. Int J Breast Cancer 2013, 250435.

Darby, I.A., Bisucci, T., Hewitson, T.D., and MacLellan, D.G. (1997). Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. Int J Biochem Cell Biol 29, 191-200.

Darby, I.A., Laverdet, B., Bonte, F., and Desmouliere, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. Clin Cosmet Investig Dermatol 7, 301-311.

Davies, M.A., and Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. Oncogene 29, 5545-5555.

De Boeck, A., Hendrix, A., Maynard, D., Van Bockstal, M., Daniels, A., Pauwels, P., Gespach, C., Bracke, M., and De Wever, O. (2013). Differential secretome analysis of cancer-associated fibroblasts and bone marrow-derived precursors to identify microenvironmental regulators of colon cancer progression. Proteomics 13, 379-388.

de Jong, R.A., Leffers, N., Boezen, H.M., ten Hoor, K.A., van der Zee, A.G., Hollema, H., and Nijman, H.W. (2009). Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. Gynecol Oncol 114, 105-110.

de Kruijf, E.M., Sajet, A., van Nes, J.G., Natanov, R., Putter, H., Smit, V.T., Liefers, G.J., van den Elsen, P.J., van de Velde, C.J., and Kuppen, P.J. (2010). HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. J Immunol 185, 7452-7459.

De Monte, L., Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., Braga, M., Di Carlo, V., Doglioni, C., and Protti, M.P. (2011). Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. The Journal of experimental medicine 208, 469-478.

de Villartay, J.P., Fischer, A., and Durandy, A. (2003). The mechanisms of immune diversification and their disorders. Nat Rev Immunol 3, 962-972.

De Wever, O., and Mareel, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. J Pathol 200, 429-447.

Deguine, J., Breart, B., Lemaitre, F., and Bousso, P. (2012). Cutting edge: tumor-targeting antibodies enhance NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity by stabilizing NK cell-tumor cell interactions. J Immunol 189, 5493-5497.

den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. The Journal of experimental medicine 192, 1685-1696.

Denk, P.O., Hoppe, J., Hoppe, V., and Knorr, M. (2003). Effect of growth factors on the activation of human Tenon's capsule fibroblasts. Curr Eye Res 27, 35-44.

Denny, W.A. (2000). The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. The Lancet. Oncology 1, 25-29.

Desmouliere, A., Darby, I.A., and Gabbiani, G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. Lab Invest 83, 1689-1707.

Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. Cancer Cell 15, 294-303.

Di Santo, J.P., and Vosshenrich, C.A. (2006). Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. Immunol Rev 214, 35-46.

Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., and Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. Cancer Immunol Immunother 58, 49-59.

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.

Diefenbach, A., and Raulet, D.H. (1999). Natural killer cells: stress out, turn on, tune in. Curr Biol 9, R851-853.

Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., et al. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. Cancer research 71, 2455-2465.

Direkze, N.C., Jeffery, R., Hodivala-Dilke, K., Hunt, T., Playford, R.J., Elia, G., Poulsom, R., Wright, N.A., and Alison, M.R. (2006). Bone marrow-derived stromal cells express lineage-related messenger RNA species. Cancer research 66, 1265-1269.

Dittmer, J., and Leyh, B. (2015). The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. Semin Cancer Biol 31, 3-15.

Doedens, A.L., Stockmann, C., Rubinstein, M.P., Liao, D., Zhang, N., DeNardo, D.G., Coussens, L.M., Karin, M., Goldrath, A.W., and Johnson, R.S. (2010). Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. Cancer research 70, 7465-7475.

Drake, C.G., Jaffee, E., and Pardoll, D.M. (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. Adv Immunol 90, 51-81.

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.

Driessens, G., Kline, J., and Gajewski, T.F. (2009). Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. Immunol Rev 229, 126-144.

Dulauroy, S., Di Carlo, S.E., Langa, F., Eberl, G., and Peduto, L. (2012). Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. Nat Med 18, 1262-1270.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nature immunology 3, 991-998.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol 22, 329-360.

Ebos, J.M., Lee, C.R., and Kerbel, R.S. (2009). Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. Clin Cancer Res 15, 5020-5025.

Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. Mol Aspects Med 29, 258-289.

Egeblad, M., Littlepage, L.E., and Werb, Z. (2005). The fibroblastic coconspirator in cancer progression. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 70, 383-388.

Egeblad, M., Rasch, M.G., and Weaver, V.M. (2010). Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. Curr Opin Cell Biol 22, 697-706.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature reviews. Cancer 2, 161-174.

Eggermont, A.M., and Kirkwood, J.M. (2004). Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? Eur J Cancer 40, 1825-1836.

Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B., and Zipp, F. (2003). Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. Cytokine 24, 244-253.

El Hage, F., Abouzahr-Rifai, S., Meslin, F., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2008). [Immune response and cancer]. Bull Cancer 95, 57-67.

Elberg, G., Chen, L., Elberg, D., Chan, M.D., Logan, C.J., and Turman, M.A. (2008). MKL1 mediates TGF-beta1-induced alphasmooth muscle actin expression in human renal epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 294, F1116-1128.

Elkabets, M., Gifford, A.M., Scheel, C., Nilsson, B., Reinhardt, F., Bray, M.A., Carpenter, A.E., Jirstrom, K., Magnusson, K., Ebert, B.L., et al. (2011). Human tumors instigate granulin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. The Journal of clinical investigation 121, 784-799.

Elliott, B.E., Tam, S.P., Dexter, D., and Chen, Z.Q. (1992). Capacity of adipose tissue to promote growth and metastasis of a murine mammary carcinoma: effect of estrogen and progesterone. Int J Cancer 51, 416-424.

Ellis, L.M., and Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. Nature reviews. Cancer 8, 579-591.

Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., and Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. Cancer Cell 17, 135-147.

Falkson, C.I., Ibrahim, J., Kirkwood, J.M., Coates, A.S., Atkins, M.B., and Blum, R.H. (1998). Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. J Clin Oncol 16, 1743-1751.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. Nature immunology 4, 1206-1212.

Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., Andre, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E., et al. (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Nat Med 15, 68-74.

Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. Blood 115, 2167-2176.

Feig, C., Jones, J.O., Kraman, M., Wells, R.J., Deonarine, A., Chan, D.S., Connell, C.M., Roberts, E.W., Zhao, Q., Caballero, O.L., et al. (2013). Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 20212-20217.

Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., and Munz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. The Journal of experimental medicine 195, 343-351.

Fernandez-Messina, L., Ashiru, O., Boutet, P., Aguera-Gonzalez, S., Skepper, J.N., Reyburn, H.T., and Vales-Gomez, M. (2010). Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. The Journal of biological chemistry 285, 8543-8551.

Fernandez-Messina, L., Reyburn, H.T., and Vales-Gomez, M. (2012). Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. Frontiers in immunology 3, 299.

Fidler, I.J., Wilmanns, C., Staroselsky, A., Radinsky, R., Dong, Z., and Fan, D. (1994). Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. Cancer metastasis reviews 13, 209-222.

Fingleton, B., Vargo-Gogola, T., Crawford, H.C., and Matrisian, L.M. (2001). Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis. Neoplasia 3, 459-468.

Flach, E.H., Rebecca, V.W., Herlyn, M., Smalley, K.S., and Anderson, A.R. (2011). Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. Mol Pharm 8, 2039-2049.

Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H., and Licona-Limon, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. Nat Rev Immunol 10, 554-567.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. Annu Rev Med 57, 1-18.

Friese, M.A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A., and Weller, M. (2004). RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. Cancer research 64, 7596-7603.

Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G.B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. The Journal of experimental medicine 196, 459-468.

Fu, L., Zhang, C., Zhang, L.Y., Dong, S.S., Lu, L.H., Chen, J., Dai, Y., Li, Y., Kong, K.L., Kwong, D.L., and Guan, X.Y. (2011). Wnt2 secreted by tumour fibroblasts promotes tumour progression in oesophageal cancer by activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway. Gut 60, 1635-1643.

Fuertes, M.B., Girart, M.V., Molinero, L.L., Domaica, C.I., Rossi, L.E., Barrio, M.M., Mordoh, J., Rabinovich, G.A., and Zwirner, N.W. (2008). Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. J Immunol 180, 4606-4614.

Fulda, S., Meyer, E., Friesen, C., Susin, S.A., Kroemer, G., and Debatin, K.M. (2001). Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. Oncogene 20, 1063-1075.

Gabbiani, G., Ryan, G.B., and Majne, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. Experientia 27, 549-550.

Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. Nat Rev Immunol 4, 941-952.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol 9, 162-174.

Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol 12, 253-268.

Gaggioli, C. (2008). Collective invasion of carcinoma cells: when the fibroblasts take the lead. Cell Adh Migr 2, 45-47.

Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. Nature immunology 14, 1014-1022.

Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J.J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., et al. (2010). Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. Eur J Cancer 46, 270-283.

Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1990). Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 7235-7239.

Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J.J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M., and Stern, P.L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. Immunol Today 18, 89-95.

Gascard, P., and Tlsty, T.D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. Genes Dev 30, 1002-1019.

Gasparini, G., Longo, R., Toi, M., and Ferrara, N. (2005). Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. Nat Clin Pract Oncol 2, 562-577.

Gavras, H., Brunner, H.R., Laragh, J.H., Sealey, J.E., Gavras, I., and Vukovich, R.A. (1974). An angiotensin converting-enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. N Engl J Med 291, 817-821.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. The Journal of experimental medicine 195, 327-333.

Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. Science 294, 605-609.

Gjerstorff, M.F., Andersen, M.H., and Ditzel, H.J. (2015). Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. Oncotarget 6, 15772-15787.

Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perform-independent mechanism. J Immunol 174, 1783-1786.

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. Nature 445, 851-857.

Grohmann, U., Fallarino, F., and Puccetti, P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. Trends Immunol 24, 242-248.

Groth, A., Kloss, S., von Strandmann, E.P., Koehl, U., and Koch, J. (2011). Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance. J Innate Immun 3, 344-354.

Grum-Schwensen, B., Klingelhofer, J., Berg, C.H., El-Naaman, C., Grigorian, M., Lukanidin, E., and Ambartsumian, N. (2005). Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. Cancer research 65, 3772-3780.

Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.M., and Raulet, D.H. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. Immunity 28, 571-580.

Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Capparelli, C., Balliet, R., Lin, Z., Pestell, R.G., Howell, A., Aquila, S., Ando, S., Martinez-Outschoorn, U., et al. (2012). Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF-beta drives tumor growth: connecting TGF-beta signaling with "Warburg-like" cancer metabolism and L-lactate production. Cell Cycle 11, 3019-3035.

Guo, X., Oshima, H., Kitmura, T., Taketo, M.M., and Oshima, M. (2008). Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. The Journal of biological chemistry 283, 19864-19871.

Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., et al. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. N Engl J Med 369, 134-144.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86, 353-364.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646-674.

Hansson, J., Aamdal, S., Bastholt, L., Brandberg, Y., Hernberg, M., Nilsson, B., Stierner, U., and von der Maase, H. (2011). Two different durations of adjuvant therapy with intermediate-dose interferon alfa-2b in patients with high-risk melanoma (Nordic IFN trial): a randomised phase 3 trial. The Lancet. Oncology 12, 144-152.

Harizi, H. (2013). Reciprocal crosstalk between dendritic cells and natural killer cells under the effects of PGE2 in immunity and immunopathology. Cell Mol Immunol 10, 213-221.

Harper, J., and Sainson, R.C. (2014). Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. Semin Cancer Biol 25, 69-77.

Harris, A.L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. Nature reviews. Cancer 2, 38-47.

Hart, D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood 90, 3245-3287.

Hasmim, M., Messai, Y., Ziani, L., Thiery, J., Bouhris, J.H., Noman, M.Z., and Chouaib, S. (2015). Critical Role of Tumor Microenvironment in Shaping NK Cell Functions: Implication of Hypoxic Stress. Frontiers in immunology 6, 482.

Haviv, I., Polyak, K., Qiu, W., Hu, M., and Campbell, I. (2009). Origin of carcinoma associated fibroblasts. Cell Cycle 8, 589-595.

Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., and Nakachi, K. (2006). Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. Cancer research 66, 563-570.

Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. The Journal of experimental medicine 192, 1391-1402.

Heidenreich, S., Zu Eulenburg, C., Hildebrandt, Y., Stubig, T., Sierich, H., Badbaran, A., Eiermann, T.H., Binder, T.M., and Kroger, N. (2012). Impact of the NK cell receptor LIR-1 (ILT-2/CD85j/LILRB1) on cytotoxicity against multiple myeloma. Clin Dev Immunol 2012, 652130.

Heldin, C.H., Rubin, K., Pietras, K., and Ostman, A. (2004). High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. Nature reviews. Cancer 4, 806-813.

Helfman, D.M., Kim, E.J., Lukanidin, E., and Grigorian, M. (2005). The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. Br J Cancer 92, 1955-1958.

Herrera, M., Herrera, A., Dominguez, G., Silva, J., Garcia, V., Garcia, J.M., Gomez, I., Soldevilla, B., Munoz, C., Provencio, M., et al. (2013). Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. Cancer Sci 104, 437-444.

Herzberg, B., and Fisher, D.E. (2016). Metastatic melanoma and immunotherapy. Clin Immunol 172, 105-110.

Hicklin, D.J., Marincola, F.M., and Ferrone, S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. Mol Med Today 5, 178-186.

Hiller, O., Lichte, A., Oberpichler, A., Kocourek, A., and Tschesche, H. (2000). Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. The Journal of biological chemistry 275, 33008-33013.

Hirata, E., Girotti, M.R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R., and Sahai, E. (2015). Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. Cancer Cell 27, 574-588.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med 363, 711-723.

Hoglund, P., and Brodin, P. (2010). Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. Nat Rev Immunol 10, 724-734.

Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., Kurtz, S., Bigosch, C., Kandioler, D., Ludwig, C., Zangemeister-Wittke, U., and Stahel, R. (2003). Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. Cell Death Differ 10, 356-364.

Horton, N.C., and Mathew, P.A. (2015). NKp44 and Natural Cytotoxicity Receptors as Damage-Associated Molecular Pattern Recognition Receptors. Frontiers in immunology 6, 31.

Hosein, A.N., Wu, M., Arcand, S.L., Lavallee, S., Hebert, J., Tonin, P.N., and Basik, M. (2010). Breast carcinoma-associated fibroblasts rarely contain p53 mutations or chromosomal aberrations. Cancer research 70, 5770-5777.

Houot, R., Perrot, I., Garcia, E., Durand, I., and Lebecque, S. (2006). Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. J Immunol 176, 5293-5298.

Hu, M., Yao, J., Cai, L., Bachman, K.E., van den Brule, F., Velculescu, V., and Polyak, K. (2005). Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. Nat Genet 37, 899-905.

Hu, Y., Yan, C., Mu, L., Huang, K., Li, X., Tao, D., Wu, Y., and Qin, J. (2015). Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. PloS one 10, e0125625.

Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. The Journal of biological chemistry 271, 32253-32259.

Huber, M.A., Kraut, N., Park, J.E., Schubert, R.D., Rettig, W.J., Peter, R.U., and Garin-Chesa, P. (2003). Fibroblast activation protein: differential expression and serine protease activity in reactive stromal fibroblasts of melanocytic skin tumors. J Invest Dermatol 120, 182-188.

Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., Lopez-Soto, A., Villa-Alvarez, M., Gonzalez-Rodriguez, A.P., and Gonzalez, S. (2014). Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer. Frontiers in immunology 5, 106.

Hughes, T., Becknell, B., Freud, A.G., McClory, S., Briercheck, E., Yu, J., Mao, C., Giovenzana, C., Nuovo, G., Wei, L., et al. (2010). Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. Immunity 32, 803-814.

Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. The Journal of experimental medicine 188, 2357-2368.

Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. Nat Rev Immunol 3, 973-983.

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. J Leukoc Biol 71, 907-920.

Iguchi-Manaka, A., Kai, H., Yamashita, Y., Shibata, K., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Yasui, T., Kikutani, H., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2008). Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. The Journal of experimental medicine 205, 2959-2964.

Iliopoulou, E.G., Kountourakis, P., Karamouzis, M.V., Doufexis, D., Ardavanis, A., Baxevanis, C.N., Rigatos, G., Papamichail, M., and Perez, S.A. (2010). A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. Cancer Immunol Immunother 59, 1781-1789.

Imai, K., Hayashi, T., Yamaoka, M., Kajimura, J., Yoshida, K., Kusunoki, Y., and Nakachi, K. (2012). Effects of NKG2D haplotypes on the cell-surface expression of NKG2D protein on natural killer and CD8 T cells of peripheral blood among atomic-bomb survivors. Hum Immunol 73, 686-691.

Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mimnaugh, E.G., Martinez, A., Cuttitta, F., and Neckers, L.M. (2002). Hsp90 regulates a von Hippel Lindauindependent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. The Journal of biological chemistry 277, 29936-29944.

Ivanov, V.N., Bhoumik, A., and Ronai, Z. (2003). Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. Oncogene 22, 3152-3161.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science 327, 291-295.

Jacquemin, G., Margiotta, D., Kasahara, A., Bassoy, E.Y., Walch, M., Thiery, J., Lieberman, J., and Martinvalet, D. (2015). Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. Cell Death Differ 22, 862-874.

Jiroutova, A., Majdiakova, L., Cermakova, M., Kohlerova, R., and Kanta, J. (2005). Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic rat liver. Acta Medica (Hradec Kralove) 48, 137-144.

Joncker, N.T., and Raulet, D.H. (2008). Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. Immunol Rev 224, 85-97.

Jones, P.L., and Jones, F.S. (2000). Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. Matrix Biol 19, 581-596.

Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Genes Dev 23, 537-548.

Jotzu, C., Alt, E., Welte, G., Li, J., Hennessy, B.T., Devarajan, E., Krishnappa, S., Pinilla, S., Droll, L., and Song, Y.H. (2010). Adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors. Anal Cell Pathol (Amst) 33, 61-79.

Jung, D.W., Che, Z.M., Kim, J., Kim, K., Kim, K.Y., and Williams, D. (2010). Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. Int J Cancer 127, 332-344.

Junttila, M.R., and de Sauvage, F.J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. Nature 501, 346-354.

Kadowaki, N. (2009). The divergence and interplay between pDC and mDC in humans. Front Biosci (Landmark Ed) 14, 808-817.

Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. Nat Rev Immunol 2, 251-262.

Kahlert, C., and Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. J Mol Med (Berl) 91, 431-437.

Kakarla, S., Chow, K.K., Mata, M., Shaffer, D.R., Song, X.T., Wu, M.F., Liu, H., Wang, L.L., Rowley, D.R., Pfizenmaier, K., and Gottschalk, S. (2013). Antitumor effects of chimeric receptor engineered human T cells directed to tumor stroma. Mol Ther 21, 1611-1620.

Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. Nature reviews. Cancer 16, 582-598.

Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. Nature reviews. Cancer 6, 392-401.

Kaspar, M., Zardi, L., and Neri, D. (2006). Fibronectin as target for tumor therapy. Int J Cancer 118, 1331-1339.

Kaur, B., Khwaja, F.W., Severson, E.A., Matheny, S.L., Brat, D.J., and Van Meir, E.G. (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. Neuro Oncol 7, 134-153.

Kerbel, R., and Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nature reviews. Cancer 2, 727-739.

Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell 141, 52-67.

Khan, N., Khan, M.K., Almasan, A., Singh, A.D., and Macklis, R. (2011). The evolving role of radiation therapy in the management of malignant melanoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 80, 645-654.

Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur J Immunol 5, 112-117.

Kim, J.H., Oh, S.H., Kim, E.J., Park, S.J., Hong, S.P., Cheon, J.H., Kim, T.I., and Kim, W.H. (2012). The role of myofibroblasts in upregulation of S100A8 and S100A9 and the differentiation of myeloid cells in the colorectal cancer microenvironment. Biochem Biophys Res Commun 423, 60-66.

Kim, U., Baumler, A., Carruthers, C., and Bielat, K. (1975). Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 72, 1012-1016.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J 14, 5579-5588.

Koch, J., Steinle, A., Watzl, C., and Mandelboim, O. (2013). Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. Trends Immunol 34, 182-191.

Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E.N., Mellody, K.T., Scheel, C., Ben-Porath, I., Onder, T.T., Wang, Z.C., Richardson, A.L., Weinberg, R.A., and Orimo, A. (2010). Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumorpromoting mammary stromal myofibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 20009-20014.

Kontani, K., Taguchi, O., Narita, T., Izawa, M., Hiraiwa, N., Zenita, K., Takeuchi, T., Murai, H., Miura, S., and Kannagi, R. (2001). Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes. Br J Cancer 84, 1258-1264.

Koong, A.C., Chen, E.Y., and Giaccia, A.J. (1994). Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. Cancer research 54, 1425-1430.

Kopelovich, L. (1982). Genetic predisposition to cancer in man: in vitro studies. Int Rev Cytol 77, 63-88.

Korn, E.L., Liu, P.Y., Lee, S.J., Chapman, J.A., Niedzwiecki, D., Suman, V.J., Moon, J., Sondak, V.K., Atkins, M.B., Eisenhauer, E.A., et al. (2008). Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. J Clin Oncol 26, 527-534.

Kouo, T., Huang, L., Pucsek, A.B., Cao, M., Solt, S., Armstrong, T., and Jaffee, E. (2015). Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. Cancer immunology research 3, 412-423. Krzewski, K., and Coligan, J.E. (2012). Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. Frontiers in immunology 3, 335.

Kumari, N., Dwarakanath, B.S., Das, A., and Bhatt, A.N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. Tumour Biol 37, 11553-11572.

Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 4966-4971.

Kurose, K., Gilley, K., Matsumoto, S., Watson, P.H., Zhou, X.P., and Eng, C. (2002). Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. Nat Genet 32, 355-357.

Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T.H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umansky, V., Paschen, A., Sucker, A., et al. (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. The Journal of clinical investigation 119, 1251-1263.

Lambert, E., Dasse, E., Haye, B., and Petitfrere, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. Crit Rev Oncol Hematol 49, 187-198.

Landowski, T.H., Qu, N., Buyuksal, I., Painter, J.S., and Dalton, W.S. (1997). Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. Blood 90, 4266-4270.

Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. Annu Rev Immunol 23, 225-274.

Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. Nature immunology 9, 495-502.

Laouar, Y., Sutterwala, F.S., Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2005). Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. Nature immunology 6, 600-607.

Le Maux Chansac, B., Misse, D., Richon, C., Vergnon, I., Kubin, M., Soria, J.C., Moretta, A., Chouaib, S., and Mami-Chouaib, F. (2008). Potentiation of NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma: role of NKG2D-dependent pathway. Int Immunol 20, 801-810.

Lee, B.K., Kim, M.J., Jang, H.S., Lee, H.R., Ahn, K.M., Lee, J.H., and Choung, P.H. (2008). A high concentration of MMP-2/gelatinase A and MMP-9/gelatinase B reduce NK cell-mediated cytotoxicity against an oral squamous cell carcinoma cell line. In Vivo 22, 593-597.

Lee, H.O., Mullins, S.R., Franco-Barraza, J., Valianou, M., Cukierman, E., and Cheng, J.D. (2011). FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. BMC Cancer 11, 245.

Lee, K., Zhang, H., Qian, D.Z., Rey, S., Liu, J.O., and Semenza, G.L. (2009). Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 17910-17915.

Lee, S.M., Betticher, D.C., and Thatcher, N. (1995). Melanoma: chemotherapy. Br Med Bull 51, 609-630.

Letterio, J.J., and Roberts, A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. Annu Rev Immunol 16, 137-161.

Lewis, C.E., and Pollard, J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. Cancer research 66, 605-612.

Lewis, J.S., Landers, R.J., Underwood, J.C., Harris, A.L., and Lewis, C.E. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. J Pathol 192, 150-158.

Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. Cancer research 61, 3819-3825.

Li, M.O., and Rudensky, A.Y. (2016). T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. Nat Rev Immunol 16, 220-233.

Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annu Rev Immunol 24, 99-146.

Li, P., Shan, J.X., Chen, X.H., Zhang, D., Su, L.P., Huang, X.Y., Yu, B.Q., Zhi, Q.M., Li, C.L., Wang, Y.Q., et al. (2015). Epigenetic silencing of microRNA-149 in cancer-associated fibroblasts mediates prostaglandin E2/interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment. Cell Res 25, 588-603.

Li, T., Yang, Y., Hua, X., Wang, G., Liu, W., Jia, C., Tai, Y., Zhang, Q., and Chen, G. (2012). Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. Cancer Lett 318, 154-161.

Li, T., Yi, S., Liu, W., Jia, C., Wang, G., Hua, X., Tai, Y., Zhang, Q., and Chen, G. (2013). Colorectal carcinoma-derived fibroblasts modulate natural killer cell phenotype and antitumor cytotoxicity. Med Oncol 30, 663.

Liao, D., and Johnson, R.S. (2007). Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. Cancer metastasis reviews 26, 281-290.

Liao, F., Rabin, R.L., Yannelli, J.R., Koniaris, L.G., Vanguri, P., and Farber, J.M. (1995). Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. The Journal of experimental medicine 182, 1301-1314.

Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat Rev Immunol 3, 361-370.

Lin, Z.Y., Chuang, Y.H., and Chuang, W.L. (2012). Cancer-associated fibroblasts up-regulate CCL2, CCL26, IL6 and LOXL2 genes related to promotion of cancer progression in hepatocellular carcinoma cells. Biomed Pharmacother 66, 525-529.

Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P., and Adema, G.J. (2013). The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. Immunology 138, 105-115.

Lion, E., Willemen, Y., Berneman, Z.N., Van Tendeloo, V.F., and Smits, E.L. (2012). Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia. Leukemia 26, 2019-2026.

Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M., and Shafie, S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature 284, 67-68.

Lipscomb, M.F., and Masten, B.J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. Physiol Rev 82, 97-130.

Liu, G., Atteridge, C.L., Wang, X., Lundgren, A.D., and Wu, J.D. (2010). The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. J Immunol 184, 3346-3350.

Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., and Bissell, M.J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. J Cell Biol 139, 1861-1872.

Loeb, L.A., Loeb, K.R., and Anderson, J.P. (2003). Multiple mutations and cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 776-781.

Loeffler, M., Kruger, J.A., Niethammer, A.G., and Reisfeld, R.A. (2006). Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. The Journal of clinical investigation 116, 1955-1962.

Loffek, S., Schilling, O., and Franzke, C.W. (2011). Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. Eur Respir J 38, 191-208.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. Clin Dev Immunol 2012, 925135.

Luga, V., Zhang, L., Viloria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., and Wrana, J.L. (2012). Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. Cell 151, 1542-1556.

Lundqvist, A., McCoy, J.P., Samsel, L., and Childs, R. (2007). Reduction of GVHD and enhanced antitumor effects after adoptive infusion of alloreactive Ly49-mismatched NK cells from MHC-matched donors. Blood 109, 3603-3606.

Luster, A.D., and Ravetch, J.V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). The Journal of experimental medicine 166, 1084-1097.

Maasho, K., Opoku-Anane, J., Marusina, A.I., Coligan, J.E., and Borrego, F. (2005). NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. J Immunol 174, 4480-4484.

Madar, S., Goldstein, I., and Rotter, V. (2013). 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. Trends Mol Med 19, 447-453.

Maecker, H.L., Yun, Z., Maecker, H.T., and Giaccia, A.J. (2002). Epigenetic changes in tumor Fas levels determine immune escape and response to therapy. Cancer Cell 2, 139-148.
Malanchi, I., Santamaria-Martinez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.A., Delaloye, J.F., and Huelsken, J. (2011). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. Nature 481, 85-89.

Manaster, I., Goldman-Wohl, D., Greenfield, C., Nachmani, D., Tsukerman, P., Hamani, Y., Yagel, S., and Mandelboim, O. (2012). MiRNA-mediated control of HLA-G expression and function. PloS one 7, e33395.

Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., and Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. Immunol Today 13, 265-270.

Marastoni, S., Ligresti, G., Lorenzon, E., Colombatti, A., and Mongiat, M. (2008). Extracellular matrix: a matter of life and death. Connect Tissue Res 49, 203-206.

Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P., and Bronte, V. (2008). Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. Immunol Rev 222, 162-179.

Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., and Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. Adv Immunol 74, 181-273.

Martinez-Outschoorn, U.E., Lisanti, M.P., and Sotgia, F. (2014). Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. Semin Cancer Biol 25, 47-60.

Marx, J. (2008). Cancer immunology. Cancer's bulwark against immune attack: MDS cells. Science 319, 154-156.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol 12, 991-1045.

McCardle, T.W., Messina, J.L., and Sondak, V.K. (2009). Completely regressed cutaneous melanocytic lesion revisited. Semin Oncol 36, 498-503.

McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. (2000). Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. Mol Med Today 6, 149-156.

McDonald, D.M., and Baluk, P. (2002). Significance of blood vessel leakiness in cancer. Cancer research 62, 5381-5385.

Meads, M.B., Gatenby, R.A., and Dalton, W.S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. Nature reviews. Cancer 9, 665-674.

Medema, J.P., de Jong, J., Peltenburg, L.T., Verdegaal, E.M., Gorter, A., Bres, S.A., Franken, K.L., Hahne, M., Albar, J.P., Melief, C.J., and Offringa, R. (2001). Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 11515-11520.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr Opin Immunol 9, 4-9.

Melillo, G. (2007). Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. Cancer metastasis reviews 26, 341-352.

Meslin, F., Thiery, J., Richon, C., Jalil, A., and Chouaib, S. (2007). Granzyme B-induced cell death involves induction of p53 tumor suppressor gene and its activation in tumor target cells. The Journal of biological chemistry 282, 32991-32999.

Meyer, C., Sevko, A., Ramacher, M., Bazhin, A.V., Falk, C.S., Osen, W., Borrello, I., Kato, M., Schadendorf, D., Baniyash, M., and Umansky, V. (2011). Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 17111-17116.

Miah, S.M., Hughes, T.L., and Campbell, K.S. (2008). KIR2DL4 differentially signals downstream functions in human NK cells through distinct structural modules. J Immunol 180, 2922-2932.

Micallef, L., Vedrenne, N., Billet, F., Coulomb, B., Darby, I.A., and Desmouliere, A. (2012). The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. Fibrogenesis Tissue Repair 5, S5.

Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell 114, 181-190.

Middleton, M.R., Grob, J.J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., Gore, M., Aamdal, S., Cebon, J., Coates, A., et al. (2000). Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. J Clin Oncol 18, 158-166.

Miller, J.S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S.A., Yun, G.H., Fautsch, S.K., McKenna, D., Le, C., Defor, T.E., Burns, L.J., et al. (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. Blood 105, 3051-3057.

Mink, S.R., Vashistha, S., Zhang, W., Hodge, A., Agus, D.B., and Jain, A. (2010). Cancer-associated fibroblasts derived from EGFR-TKI-resistant tumors reverse EGFR pathway inhibition by EGFR-TKIs. Mol Cancer Res 8, 809-820.

Mishra, P.J., Humeniuk, R., Medina, D.J., Alexe, G., Mesirov, J.P., Ganesan, S., Glod, J.W., and Banerjee, D. (2008). Carcinomaassociated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. Cancer research 68, 4331-4339.

Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2004). Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. J Immunol 172, 4676-4680.

Mitra, A., Mishra, L., and Li, S. (2015). EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. Oncotarget 6, 10697-10711.

Mittal, S.K., Cho, K.J., Ishido, S., and Roche, P.A. (2015). Interleukin 10 (IL-10)-mediated Immunosuppression: MARCH-I INDUCTION REGULATES ANTIGEN PRESENTATION BY MACROPHAGES BUT NOT DENDRITIC CELLS. The Journal of biological chemistry 290, 27158-27167.

Mohan, M.J., Seaton, T., Mitchell, J., Howe, A., Blackburn, K., Burkhart, W., Moyer, M., Patel, I., Waitt, G.M., Becherer, J.D., et al. (2002). The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. Biochemistry 41, 9462-9469.

Moretta, L., and Moretta, A. (2004). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. EMBO J 23, 255-259.

Mortier, L., Marchetti, P., Gordower, L., Charbonnier-Hatzfeld, A.S., Toungouz, M., and Velu, T. (2004). [New therapeutic approachs in melanoma]. Rev Med Brux 25, 153-159.

Mrazek, A.A., Carmical, J.R., Wood, T.G., Hellmich, M.R., Eltorky, M., Bohanon, F.J., and Chao, C. (2014). Colorectal Cancer-Associated Fibroblasts are Genotypically Distinct. Curr Cancer Ther Rev 10, 97-218.

Mueller, L., Goumas, F.A., Affeldt, M., Sandtner, S., Gehling, U.M., Brilloff, S., Walter, J., Karnatz, N., Lamszus, K., Rogiers, X., and Broering, D.C. (2007). Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. Am J Pathol 171, 1608-1618.

Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A., and Mellor, A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. The Journal of clinical investigation 114, 280-290.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. Nature reviews. Cancer 8, 618-631.

Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. Nature reviews. Cancer 8, 929-941.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity 41, 14-20.

Nausch, N., and Cerwenka, A. (2008). NKG2D ligands in tumor immunity. Oncogene 27, 5944-5958.

Nazareth, M.R., Broderick, L., Simpson-Abelson, M.R., Kelleher, R.J., Jr., Yokota, S.J., and Bankert, R.B. (2007). Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. J Immunol 178, 5552-5562.

Neumann, L., Pforr, C., Beaudouin, J., Pappa, A., Fricker, N., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., and Eils, R. (2010). Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. Mol Syst Biol 6, 352.

Nishi, H., Nishi, K.H., and Johnson, A.C. (2002). Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. Cancer research 62, 827-834.

Noman, M.Z., Buart, S., Romero, P., Ketari, S., Janji, B., Mari, B., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2012). Hypoxia-inducible miR-210 regulates the susceptibility of tumor cells to lysis by cytotoxic T cells. Cancer research 72, 4629-4641.

Noman, M.Z., Buart, S., Van Pelt, J., Richon, C., Hasmim, M., Leleu, N., Suchorska, W.M., Jalil, A., Lecluse, Y., El Hage, F., et al. (2009). The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. J Immunol 182, 3510-3521.

Noman, M.Z., and Chouaib, S. (2014). Targeting hypoxia at the forefront of anticancer immune responses. Oncoimmunology 3, e954463.

Noman, M.Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., and Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. The Journal of experimental medicine 211, 781-790.

Noman, M.Z., Janji, B., Kaminska, B., Van Moer, K., Pierson, S., Przanowski, P., Buart, S., Berchem, G., Romero, P., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2011a). Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. Cancer research 71, 5976-5986.

Noman, M.Z., Messai, Y., Carre, T., Akalay, I., Meron, M., Janji, B., Hasmim, M., and Chouaib, S. (2011b). Microenvironmental hypoxia orchestrating the cell stroma cross talk, tumor progression and antitumor response. Crit Rev Immunol 31, 357-377.

O'Connell, J.T., Sugimoto, H., Cooke, V.G., MacDonald, B.A., Mehta, A.I., LeBleu, V.S., Dewar, R., Rocha, R.M., Brentani, R.R., Resnick, M.B., et al. (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 16002-16007.

Ochoa, J.B., Strange, J., Kearney, P., Gellin, G., Endean, E., and Fitzpatrick, E. (2001). Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition 25, 23-29.

Ohlund, D., Elyada, E., and Tuveson, D. (2014). Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. The Journal of experimental medicine 211, 1503-1523.

Ohm, J.E., Gabrilovich, D.I., Sempowski, G.D., Kisseleva, E., Parman, K.S., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (2003). VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. Blood 101, 4878-4886.

Olaso, E., Salado, C., Egilegor, E., Gutierrez, V., Santisteban, A., Sancho-Bru, P., Friedman, S.L., and Vidal-Vanaclocha, F. (2003). Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. Hepatology 37, 674-685.

Olaso, E., Santisteban, A., Bidaurrazaga, J., Gressner, A.M., Rosenbaum, J., and Vidal-Vanaclocha, F. (1997). Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. Hepatology 26, 634-642.

Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell 121, 335-348.

Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer metastasis reviews 8, 98-101.

Paik, S.S., Oh, Y.H., Jang, K.S., Han, H.X., and Cho, S.H. (2004). Uterine leiomyoma with massive lymphoid infiltration: case report and review of the literature. Pathol Int 54, 343-348.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. Nature immunology 8, 1353-1362.

Paraiso, K.H., and Smalley, K.S. (2013). Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. Biochemical pharmacology 85, 1033-1041.

Park, C.C., Bissell, M.J., and Barcellos-Hoff, M.H. (2000a). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. Mol Med Today 6, 324-329.

Park, H.I., Ni, J., Gerkema, F.E., Liu, D., Belozerov, V.E., and Sang, Q.X. (2000b). Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. The Journal of biological chemistry 275, 20540-20544.

Park, J.E., Lenter, M.C., Zimmermann, R.N., Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. The Journal of biological chemistry 274, 36505-36512.

Pasquali, S., Spillane, A.J., de Wilt, J.H., McCaffery, K., Rossi, C.R., Quinn, M.J., Saw, R.P., Shannon, K.F., Stretch, J.R., and Thompson, J.F. (2012). Surgeons' opinions on lymphadenectomy in melanoma patients with positive sentinel nodes: a worldwide web-based survey. Ann Surg Oncol 19, 4322-4329.

Passlick, B., Pantel, K., Kubuschok, B., Angstwurm, M., Neher, A., Thetter, O., Schweiberer, L., and Izbicki, J.R. (1996). Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: association with early lymphatic spread of tumour cells. Eur J Cancer 32A, 141-145.

Patocs, A., Zhang, L., Xu, Y., Weber, F., Caldes, T., Mutter, G.L., Platzer, P., and Eng, C. (2007). Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. N Engl J Med 357, 2543-2551.

Paul, P., Rouas-Freiss, N., Khalil-Daher, I., Moreau, P., Riteau, B., Le Gal, F.A., Avril, M.F., Dausset, J., Guillet, J.G., and Carosella, E.D. (1998). HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 4510-4515.

Paunescu, V., Bojin, F.M., Tatu, C.A., Gavriliuc, O.I., Rosca, A., Gruia, A.T., Tanasie, G., Bunu, C., Crisnic, D., Gherghiceanu, M., et al. (2011). Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. J Cell Mol Med 15, 635-646.

Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., et al. (2009). The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. Cell Cycle 8, 3984-4001.

Pena, C., Cespedes, M.V., Lindh, M.B., Kiflemariam, S., Mezheyeuski, A., Edqvist, P.H., Hagglof, C., Birgisson, H., Bojmar, L., Jirstrom, K., et al. (2013). STC1 expression by cancer-associated fibroblasts drives metastasis of colorectal cancer. Cancer research 73, 1287-1297.

Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., et al. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. The Journal of experimental medicine 190, 1505-1516.

Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, S., Chang, C.C., Biassoni, R., Conte, R., Kubin, M., Cosman, D., Ferrone, S., Moretta, L., and Moretta, A. (2002). Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. Cancer research 62, 6178-6186.

Peng, Y.P., Zhang, J.J., Liang, W.B., Tu, M., Lu, Z.P., Wei, J.S., Jiang, K.R., Gao, W.T., Wu, J.L., Xu, Z.K., et al. (2014). Elevation of MMP-9 and IDO induced by pancreatic cancer cells mediates natural killer cell dysfunction. BMC Cancer 14, 738.

Petrella, T., Quirt, I., Verma, S., Haynes, A.E., Charette, M., and Bak, K. (2007). Single-agent interleukin-2 in the treatment of metastatic melanoma: a systematic review. Cancer Treat Rev 33, 484-496.

Phan, G.Q., Attia, P., Steinberg, S.M., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2001). Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol 19, 3477-3482.

Picard, O., Rolland, Y., and Poupon, M.F. (1986). Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in nude mice: implication for implantation of metastases. Cancer research 46, 3290-3294.

Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. The Journal of experimental medicine 195, 335-341.

Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Beswick, E.J., Boya, G., Qiu, S.M., Mifflin, R.C., Raju, G.S., Reyes, V.E., and Powell, D.W. (2008). PD-1 ligand expression by human colonic myofibroblasts/fibroblasts regulates CD4+ T-cell activity. Gastroenterology 135, 1228-1237, 1237 e1221-1222.

Pinkoski, M.J., Waterhouse, N.J., Heibein, J.A., Wolf, B.B., Kuwana, T., Goldstein, J.C., Newmeyer, D.D., Bleackley, R.C., and Green, D.R. (2001). Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. The Journal of biological chemistry 276, 12060-12067.

Potenta, S., Zeisberg, E., and Kalluri, R. (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. Br J Cancer 99, 1375-1379.

Pupa, S.M., Menard, S., Forti, S., and Tagliabue, E. (2002). New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. J Cell Physiol 192, 259-267.

Qadir, A.S., Lee, H.L., Baek, K.H., Park, H.J., Woo, K.M., Ryoo, H.M., and Baek, J.H. (2011). Msx2 is required for TNF-alphainduced canonical Wnt signaling in 3T3-L1 preadipocytes. Biochem Biophys Res Commun 408, 399-404.

Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med 19, 1423-1437.

Quatromoni, J.G., and Eruslanov, E. (2012). Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. Am J Transl Res 4, 376-389.

Radosavljevic, M., Cuillerier, B., Wilson, M.J., Clement, O., Wicker, S., Gilfillan, S., Beck, S., Trowsdale, J., and Bahram, S. (2002). A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. Genomics 79, 114-123.

Raman, D., Baugher, P.J., Thu, Y.M., and Richmond, A. (2007). Role of chemokines in tumor growth. Cancer Lett 256, 137-165.

Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Scudiero, D.A., Selby, M., Sausville, E.A., Shoemaker, R.H., and Melillo, G. (2002). Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. Cancer research 62, 4316-4324.

Rasanen, K., and Vaheri, A. (2010). Activation of fibroblasts in cancer stroma. Exp Cell Res 316, 2713-2722.

Rasmussen, A.A., and Cullen, K.J. (1998). Paracrine/autocrine regulation of breast cancer by the insulin-like growth factors. Breast Cancer Res Treat 47, 219-233.

Ray, A., Cot, M., Puzo, G., Gilleron, M., and Nigou, J. (2013). Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. Biochimie 95, 33-42.

Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. The Journal of experimental medicine 192, 295-302.

Redman, J.M., Gibney, G.T., and Atkins, M.B. (2016). Advances in immunotherapy for melanoma. BMC Med 14, 20.

Reefman, E., Kay, J.G., Wood, S.M., Offenhauser, C., Brown, D.L., Roy, S., Stanley, A.C., Low, P.C., Manderson, A.P., and Stow, J.L. (2010). Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. J Immunol 184, 4852-4862.

Reschner, A., Hubert, P., Delvenne, P., Boniver, J., and Jacobs, N. (2008). Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. Clin Exp Immunol 152, 219-226.

Restifo, N.P., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J.W., Mule, J.J., Rosenberg, S.A., and Bennink, J.R. (1993). Identification of human cancers deficient in antigen processing. The Journal of experimental medicine 177, 265-272.

Robert, C., and Ghiringhelli, F. (2009). What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? Oncologist 14, 848-861.

Robertson, M.J. (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. J Leukoc Biol 71, 173-183.

Robertson, M.J., Caligiuri, M.A., Manley, T.J., Levine, H., and Ritz, J. (1990). Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytolysis. J Immunol 145, 3194-3201.

Roca, H., Varsos, Z.S., Sud, S., Craig, M.J., Ying, C., and Pienta, K.J. (2009). CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. The Journal of biological chemistry 284, 34342-34354.

Rohwer, N., and Cramer, T. (2011). Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. Drug Resist Updat 14, 191-201.

Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M.J., Touvrey, C., Iancu, E.M., Corthesy, P., Devevre, E., Speiser, D.E., and Rufer, N. (2007). Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. J Immunol 178, 4112-4119.

Ronnov-Jessen, L., and Petersen, O.W. (1993). Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. Lab Invest 68, 696-707.

Ronnov-Jessen, L., Petersen, O.W., and Bissell, M.J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. Physiol Rev 76, 69-125.

Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S.C., Schall, T.J., and Dahinden, C.A. (1992). RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. The Journal of experimental medicine 176, 1489-1495.

Rousalova, I., and Krepela, E. (2010). Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). Int J Oncol 37, 1361-1378.

Sala, F.G., Del Moral, P.M., Pizzato, N., Legrand-Abravanel, F., Le Bouteiller, P., and Lenfant, F. (2004). The HLA-G\*0105N null allele induces cell surface expression of HLA-E molecule and promotes CD94/NKG2A-mediated recognition in JAR choriocarcinoma cell line. Immunogenetics 56, 617-624.

Salih, H.R., Goehlsdorf, D., and Steinle, A. (2006). Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. Hum Immunol 67, 188-195.

Salih, H.R., Holdenrieder, S., and Steinle, A. (2008). Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. Front Biosci 13, 3448-3456.

Salih, H.R., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. J Immunol 169, 4098-4102.

Sanborn, J.Z., Chung, J., Purdom, E., Wang, N.J., Kakavand, H., Wilmott, J.S., Butler, T., Thompson, J.F., Mann, G.J., Haydu, L.E., et al. (2015). Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112, 10995-11000.

Santos, A.M., Jung, J., Aziz, N., Kissil, J.L., and Pure, E. (2009). Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. The Journal of clinical investigation 119, 3613-3625.

Sappino, A.P., Skalli, O., Jackson, B., Schurch, W., and Gabbiani, G. (1988). Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. Int J Cancer 41, 707-712.

Savage, N.D., de Boer, T., Walburg, K.V., Joosten, S.A., van Meijgaarden, K., Geluk, A., and Ottenhoff, T.H. (2008). Human antiinflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. J Immunol 181, 2220-2226.

Scherz-Shouval, R., Santagata, S., Mendillo, M.L., Sholl, L.M., Ben-Aharon, I., Beck, A.H., Dias-Santagata, D., Koeva, M., Stemmer, S.M., Whitesell, L., and Lindquist, S. (2014). The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy. Cell 158, 564-578.

Scholz, C.C., and Taylor, C.T. (2013). Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. Current opinion in pharmacology 13, 646-653.

Schor, S.L., Haggie, J.A., Durning, P., Howell, A., Smith, L., Sellwood, R.A., and Crowther, D. (1986). Occurrence of a fetal fibroblast phenotype in familial breast cancer. Int J Cancer 37, 831-836.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol 75, 163-189.

Schultz, G.S., and Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. Wound Repair Regen 17, 153-162.

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. Science 348, 69-74.

Schwinn, N., Vokhminova, D., Sucker, A., Textor, S., Striegel, S., Moll, I., Nausch, N., Tuettenberg, J., Steinle, A., Cerwenka, A., et al. (2009). Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytolysis of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. Int J Cancer 124, 1594-1604.

Scolyer, R.A., Long, G.V., and Thompson, J.F. (2011). Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. Mol Oncol 5, 124-136.

Seetharamu, N., Ott, P.A., and Pavlick, A.C. (2009). Novel therapeutics for melanoma. Expert Rev Anticancer Ther 9, 839-849.

Semenza, G.L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis. Curr Opin Genet Dev 8, 588-594.

Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nature reviews. Cancer 3, 721-732.

Semenza, G.L. (2009). HIF-1 inhibitors for cancer therapy: from gene expression to drug discovery. Curr Pharm Des 15, 3839-3843.

Semenza, G.L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene 29, 625-634.

Semenza, G.L. (2011). Oxygen sensing, homeostasis, and disease. N Engl J Med 365, 537-547.

Semenza, G.L. (2012a). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell 148, 399-408.

Semenza, G.L. (2012b). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. Trends in pharmacological sciences 33, 207-214.

Semenza, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol 12, 5447-5454.

Serra, P., Amrani, A., Yamanouchi, J., Han, B., Thiessen, S., Utsugi, T., Verdaguer, J., and Santamaria, P. (2003). CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. Immunity 19, 877-889.

Serrano, A.E., Menares-Castillo, E., Garrido-Tapia, M., Ribeiro, C.H., Hernandez, C.J., Mendoza-Naranjo, A., Gatica-Andrades, M., Valenzuela-Diaz, R., Zuniga, R., Lopez, M.N., et al. (2011). Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. Immunology and cell biology 89, 447-457.

Serres, S., O'Brien, E.R., and Sibson, N.R. (2014). Imaging angiogenesis, inflammation, and metastasis in the tumor microenvironment with magnetic resonance imaging. Adv Exp Med Biol 772, 263-283.

Sethi, T., Rintoul, R.C., Moore, S.M., MacKinnon, A.C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E.R., Dransfield, I., Donnelly, S.C., Strieter, R., and Haslett, C. (1999). Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. Nat Med 5, 662-668.

Shain, A.H., and Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. Nature reviews. Cancer 16, 345-358.

Shay, J.E., and Celeste Simon, M. (2012). Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism. Semin Cell Dev Biol 23, 389-394.

Sherman, M.H., Yu, R.T., Engle, D.D., Ding, N., Atkins, A.R., Tiriac, H., Collisson, E.A., Connor, F., Van Dyke, T., Kozlov, S., et al. (2014). Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. Cell 159, 80-93.

Shilling, H.G., McQueen, K.L., Cheng, N.W., Shizuru, J.A., Negrin, R.S., and Parham, P. (2003). Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. Blood 101, 3730-3740.

Shimoda, M., Mellody, K.T., and Orimo, A. (2010). Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. Semin Cell Dev Biol 21, 19-25.

Shimoda, M., Principe, S., Jackson, H.W., Luga, V., Fang, H., Molyneux, S.D., Shao, Y.W., Aiken, A., Waterhouse, P.D., Karamboulas, C., et al. (2014). Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state. Nat Cell Biol 16, 889-901.

Shin, H., and Iwasaki, A. (2013). Tissue-resident memory T cells. Immunol Rev 255, 165-181.

Shiraishi, K., Mimura, K., Kua, L.F., Koh, V., Siang, L.K., Nakajima, S., Fujii, H., Shabbir, A., Yong, W.P., So, J., et al. (2016). Inhibition of MMP activity can restore NKG2D ligand expression in gastric cancer, leading to improved NK cell susceptibility. J Gastroenterol 51, 1101-1111.

Sica, A., and Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. The Journal of clinical investigation 117, 1155-1166.

Sillett, H.K., Cruickshank, S.M., Southgate, J., and Trejdosiewicz, L.K. (2001). Transforming growth factor-beta promotes 'death by neglect' in post-activated human T cells. Immunology 102, 310-316.

Singh, M., Lin, J., Hocker, T.L., and Tsao, H. (2008). Genetics of melanoma tumorigenesis. Br J Dermatol 158, 15-21.

Sinha, P., Okoro, C., Foell, D., Freeze, H.H., Ostrand-Rosenberg, S., and Srikrishna, G. (2008). Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. J Immunol 181, 4666-4675.

Sis, B., Sarioglu, S., Sokmen, S., Sakar, M., Kupelioglu, A., and Fuzun, M. (2005). Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma. J Clin Pathol 58, 32-38.

Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. Eur J Immunol 29, 1656-1666.

Slavuljica, I., Krmpotic, A., and Jonjic, S. (2011). Manipulation of NKG2D ligands by cytomegaloviruses: impact on innate and adaptive immune response. Frontiers in immunology 2, 85.

Sleeman, J.P. (2012). The metastatic niche and stromal progression. Cancer metastasis reviews 31, 429-440.

Slominski, A., Wortsman, J., Carlson, A.J., Matsuoka, L.Y., Balch, C.M., and Mihm, M.C. (2001). Malignant melanoma. Arch Pathol Lab Med 125, 1295-1306.

Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. Nature immunology 2, 293-299.

Sneddon, J.B., and Werb, Z. (2007). Location, location; the cancer stem cell niche. Cell Stem Cell 1, 607-611.

Snyder, R.J., Lantis, J., Kirsner, R.S., Shah, V., Molyneaux, M., and Carter, M.J. (2016). Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use. Wound Repair Regen 24, 613-629.

Spanholtz, J., Tordoir, M., Eissens, D., Preijers, F., van der Meer, A., Joosten, I., Schaap, N., de Witte, T.M., and Dolstra, H. (2010). High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. PloS one 5, e9221.

Spits, H., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1995). Development of human T and natural killer cells. Blood 85, 2654-2670.

Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. Immunity 12, 599-609.

Srivastava, R.M., Savithri, B., and Khar, A. (2003). Activating and inhibitory receptors and their role in natural killer cell function. Indian J Biochem Biophys 40, 291-299.

Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K., Wallace, M.H., Hawk, E., Gordon, G.B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., et al. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 342, 1946-1952.

Sterchi, E.E. (2008). Special issue: metzincin metalloproteinases. Mol Aspects Med 29, 255-257.

Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 17, 463-516.

Stevens, M.F., Hickman, J.A., Langdon, S.P., Chubb, D., Vickers, L., Stone, R., Baig, G., Goddard, C., Gibson, N.W., Slack, J.A., and et al. (1987). Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. Cancer research 47, 5846-5852.

Storch, K.N., Taatjes, D.J., Bouffard, N.A., Locknar, S., Bishop, N.M., and Langevin, H.M. (2007). Alpha smooth muscle actin distribution in cytoplasm and nuclear invaginations of connective tissue fibroblasts. Histochem Cell Biol 127, 523-530.

Straume, O., Sviland, L., and Akslen, L.A. (2000). Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. Clin Cancer Res 6, 1845-1853.

Strausberg, R.L. (2005). Tumor microenvironments, the immune system and cancer survival. Genome Biol 6, 211.

Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., et al. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. Nature 487, 500-504.

Stuelten, C.H., DaCosta Byfield, S., Arany, P.R., Karpova, T.S., Stetler-Stevenson, W.G., and Roberts, A.B. (2005). Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. J Cell Sci 118, 2143-2153.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 352, 987-996.

Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., and Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. Cancer biology & therapy 5, 1640-1646.

Sui, H., Zhu, L., Deng, W., and Li, Q. (2014). Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance: role, molecular mechanisms, and therapeutic strategies. Oncol Res Treat 37, 584-589.

Sun, D., Wang, X., Zhang, H., Deng, L., and Zhang, Y. (2011). MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. Cell Biol Int 35, 569-574.

Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., and Trapani, J.A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. The Journal of experimental medicine 192, 1403-1414.

Sutton, V.R., Wowk, M.E., Cancilla, M., and Trapani, J.A. (2003). Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. Immunity 18, 319-329.

Takata, H., and Takiguchi, M. (2006). Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. J Immunol 177, 4330-4340.

Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Harris, A.L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. Am J Pathol 157, 411-421.

Tampe, B., and Zeisberg, M. (2014). Contribution of genetics and epigenetics to progression of kidney fibrosis. Nephrol Dial Transplant 29 Suppl 4, iv72-79.

Tarazona, R., Duran, E., and Solana, R. (2015). Natural Killer Cell Recognition of Melanoma: New Clues for a More Effective Immunotherapy. Frontiers in immunology 6, 649.

Tarhini, A.A., Kirkwood, J.M., Gooding, W.E., Cai, C., and Agarwala, S.S. (2007). Durable complete responses with high-dose bolus interleukin-2 in patients with metastatic melanoma who have experienced progression after biochemotherapy. J Clin Oncol 25, 3802-3807.

Tarin, D., and Croft, C.B. (1969). Ultrastructural features of wound healing in mouse skin. J Anat 105, 189-190.

Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., Dubreuil, O., Carpentier, A.F., Tartour, E., and Taieb, J. (2013). VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. Cancer research 73, 539-549.

Testori, A., Rutkowski, P., Marsden, J., Bastholt, L., Chiarion-Sileni, V., Hauschild, A., and Eggermont, A.M. (2009). Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. Ann Oncol 20 Suppl 6, vi22-29.

Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. Nature immunology 12, 770-777.

Thiery, J., and Lieberman, J. (2014). Perforin: a key pore-forming protein for immune control of viruses and cancer. Subcell Biochem 80, 197-220.

Thiery, J., Safta, T.B., Ziani, L., and Chouaib, S. (2015). Mechanisms of Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis and Relationship with the Tumor Suppressor p53. Crit Rev Immunol 35, 433-449.

Thomas, D.A., and Massague, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. Cancer Cell 8, 369-380.

Tjomsland, V., Spangeus, A., Valila, J., Sandstrom, P., Borch, K., Druid, H., Falkmer, S., Falkmer, U., Messmer, D., and Larsson, M. (2011). Interleukin 1alpha sustains the expression of inflammatory factors in human pancreatic cancer microenvironment by targeting cancer-associated fibroblasts. Neoplasia 13, 664-675.

Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 349-363.

Tomsova, M., Melichar, B., Sedlakova, I., and Steiner, I. (2008). Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. Gynecol Oncol 108, 415-420.

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.

Topalian, S.L., Sznol, M., McDermott, D.F., Kluger, H.M., Carvajal, R.D., Sharfman, W.H., Brahmer, J.R., Lawrence, D.P., Atkins, M.B., Powderly, J.D., et al. (2014). Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. J Clin Oncol 32, 1020-1030.

Toullec, A., Gerald, D., Despouy, G., Bourachot, B., Cardon, M., Lefort, S., Richardson, M., Rigaill, G., Parrini, M.C., Lucchesi, C., et al. (2010). Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. EMBO Mol Med 2, 211-230.

Trinh, V.A. (2008). Current management of metastatic melanoma. Am J Health Syst Pharm 65, S3-8.

Ugel, S., Delpozzo, F., Desantis, G., Papalini, F., Simonato, F., Sonda, N., Zilio, S., and Bronte, V. (2009). Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. Current opinion in pharmacology 9, 470-481.

Uria, J.A., and Lopez-Otin, C. (2000). Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. Cancer research 60, 4745-4751.

Valable, S., Barbier, E.L., Bernaudin, M., Roussel, S., Segebarth, C., Petit, E., and Remy, C. (2008). In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. Neuroimage 40, 973-983.

van Houdt, I.S., Oudejans, J.J., van den Eertwegh, A.J., Baars, A., Vos, W., Bladergroen, B.A., Rimoldi, D., Muris, J.J., Hooijberg, E., Gundy, C.M., et al. (2005). Expression of the apoptosis inhibitor protease inhibitor 9 predicts clinical outcome in vaccinated patients with stage III and IV melanoma. Clin Cancer Res 11, 6400-6407.

Vandenbroucke, R.E., and Libert, C. (2014). Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? Nat Rev Drug Discov 13, 904-927.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 324, 1029-1033.

Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., and Ashkenazi, A. (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. The Journal of biological chemistry 280, 40599-40608.

Vetter, C.S., Groh, V., thor Straten, P., Spies, T., Brocker, E.B., and Becker, J.C. (2002). Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. J Invest Dermatol 118, 600-605.

Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol 8, 523-532.

Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. The Journal of experimental medicine 187, 2065-2072.

Vivier, E., Nunes, J.A., and Vely, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. Science 306, 1517-1519.

Vona-Davis, L., and Gibson, L.F. (2013). Adipocytes as a critical component of the tumor microenvironment. Leuk Res 37, 483-484.

Voron, T., Marcheteau, E., Pernot, S., Colussi, O., Tartour, E., Taieb, J., and Terme, M. (2014). Control of the immune response by pro-angiogenic factors. Front Oncol 4, 70.

Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., Macconaill, L.E., Hahn, W.C., et al. (2011). Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. J Clin Oncol 29, 3085-3096.

Walczak, H. (2011). TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. Immunol Rev 244, 9-28.

Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. Cancer research 66, 2520-2526.

Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J., and Vivier, E. (2007). Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. Curr Opin Immunol 19, 365-372.

Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. Immunol Rev 220, 199-213.

Wang, G.L., Jiang, B.H., and Semenza, G.L. (1995). Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxiainducible factor 1. Biochem Biophys Res Commun 216, 669-675.

Wang, G.Q., Wieckowski, E., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X.M., and Rabinowich, H. (2001). Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. The Journal of experimental medicine 194, 1325-1337.

Wang, W., Li, Q., Yamada, T., Matsumoto, K., Matsumoto, I., Oda, M., Watanabe, G., Kayano, Y., Nishioka, Y., Sone, S., and Yano, S. (2009). Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. Clin Cancer Res 15, 6630-6638.

Weber, J.S., Kahler, K.C., and Hauschild, A. (2012). Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. J Clin Oncol 30, 2691-2697.

Weide, B., Eigentler, T.K., Pflugfelder, A., Leiter, U., Meier, F., Bauer, J., Schmidt, D., Radny, P., Pfohler, C., and Garbe, C. (2011). Survival after intratumoral interleukin-2 treatment of 72 melanoma patients and response upon the first chemotherapy during follow-up. Cancer Immunol Immunother 60, 487-493.

Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression. FASEB J 16, 1151-1162.

Wernert, N., Locherbach, C., Wellmann, A., Behrens, P., and Hugel, A. (2001). Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers. Anticancer Res 21, 2259-2264.

Werno, C., Menrad, H., Weigert, A., Dehne, N., Goerdt, S., Schledzewski, K., Kzhyshkowska, J., and Brune, B. (2010). Knockout of HIF-1alpha in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. Carcinogenesis 31, 1863-1872.

Wigerup, C., Pahlman, S., and Bexell, D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. Pharmacology & therapeutics 164, 152-169.

Williams, T.E., Nagarajan, S., Selvaraj, P., and Zhu, C. (2000). Concurrent and independent binding of Fcgamma receptors IIa and IIIb to surface-bound IgG. Biophys J 79, 1867-1875.

Wilson, N.S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. Nature immunology 10, 348-355.

Wilson, T.R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., et al. (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. Nature 487, 505-509.

Wilson, W.R., and Hay, M.P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. Nature reviews. Cancer 11, 393-410.

Witz, I.P. (2008). Tumor-microenvironment interactions: dangerous liaisons. Adv Cancer Res 100, 203-229.

Wohlfart, S., Sebinger, D., Gruber, P., Buch, J., Polgar, D., Krupitza, G., Rosner, M., Hengstschlager, M., Raderer, M., Chott, A., and Mullauer, L. (2004). FAS (CD95) mutations are rare in gastric MALT lymphoma but occur more frequently in primary gastric diffuse large B-cell lymphoma. Am J Pathol 164, 1081-1089.

Wolchok, J.D., Hoos, A., O'Day, S., Weber, J.S., Hamid, O., Lebbe, C., Maio, M., Binder, M., Bohnsack, O., Nichol, G., et al. (2009). Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. Clin Cancer Res 15, 7412-7420.

Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., and Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. Nat Cell Biol 9, 893-904.

Woll, P.S., Martin, C.H., Miller, J.S., and Kaufman, D.S. (2005). Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. J Immunol 175, 5095-5103.

Wu, C., Thalhamer, T., Franca, R.F., Xiao, S., Wang, C., Hotta, C., Zhu, C., Hirashima, M., Anderson, A.C., and Kuchroo, V.K. (2014). Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells. Immunity 41, 270-282.

Wu, M.H., Hong, H.C., Hong, T.M., Chiang, W.F., Jin, Y.T., and Chen, Y.L. (2011). Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression. Clin Cancer Res 17, 1306-1316.

Xin, Z.F., Kim, Y.K., and Jung, S.T. (2009). Risedronate inhibits human osteosarcoma cell invasion. J Exp Clin Cancer Res 28, 105.

Xing, F., Saidou, J., and Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. Front Biosci (Landmark Ed) 15, 166-179.

Xouri, G., and Christian, S. (2010). Origin and function of tumor stroma fibroblasts. Semin Cell Dev Biol 21, 40-46.

Xu, X., Chen, L., Guerry, D., Dawson, P.R., Hwang, W.T., VanBelle, P., Elder, D.E., Zhang, P.J., Ming, M.E., Schuchter, L., and Gimotty, P.A. (2012). Lymphatic invasion is independently prognostic of metastasis in primary cutaneous melanoma. Clin Cancer Res 18, 229-237.

Yamanegi, K., Yamane, J., Kobayashi, K., Ohyama, H., Nakasho, K., Yamada, N., Hata, M., Fukunaga, S., Futani, H., Okamura, H., and Terada, N. (2012). Downregulation of matrix metalloproteinase-9 mRNA by valproic acid plays a role in inhibiting the shedding of MHC class I-related molecules A and B on the surface of human osteosarcoma cells. Oncol Rep 28, 1585-1590.

Yang, F., Tuxhorn, J.A., Ressler, S.J., McAlhany, S.J., Dang, T.D., and Rowley, D.R. (2005). Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. Cancer research 65, 8887-8895.

Yokoyama, W.M. (2000). Now you see it, now you don't! Nature immunology 1, 95-97.

Yokoyama, W.M., and Kim, S. (2006). How do natural killer cells find self to achieve tolerance? Immunity 24, 249-257.

Yoshimura, T., Howard, O.M., Ito, T., Kuwabara, M., Matsukawa, A., Chen, K., Liu, Y., Liu, M., Oppenheim, J.J., and Wang, J.M. (2013). Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. PloS one 8, e58791.

Yu, J., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2013). Location and cellular stages of natural killer cell development. Trends Immunol 34, 573-582.

Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. Genes Dev 14, 163-176.

Zeestraten, E.C., Reimers, M.S., Saadatmand, S., Goossens-Beumer, I.J., Dekker, J.W., Liefers, G.J., van den Elsen, P.J., van de Velde, C.J., and Kuppen, P.J. (2014). Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients. Br J Cancer 110, 459-468.

Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. Cancer research 67, 10123-10128.

Zeisberg, E.M., and Zeisberg, M. (2013). The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. J Pathol 229, 264-273.

Zeng, W., Liu, P., Pan, W., Singh, S.R., and Wei, Y. (2015). Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism. Cancer Lett 356, 263-267.

Zhang, H., Qian, D.Z., Tan, Y.S., Lee, K., Gao, P., Ren, Y.R., Rey, S., Hammers, H., Chang, D., Pili, R., et al. (2008). Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 19579-19586.

Zhang, L., and Fang, B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. Cancer gene therapy 12, 228-237.

Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, 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. Nature immunology 6, 1245-1252.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood 112, 1557-1569.

Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J Leukoc Biol 81, 584-592.

Zingoni, A., Ardolino, M., Santoni, A., and Cerboni, C. (2012). NKG2D and DNAM-1 activating receptors and their ligands in NK-T cell interactions: role in the NK cell-mediated negative regulation of T cell responses. Frontiers in immunology 3, 408.

Zitka, O., Kukacka, J., Krizkova, S., Huska, D., Adam, V., Masarik, M., Prusa, R., and Kizek, R. (2010). Matrix metalloproteinases. Curr Med Chem 17, 3751-3768.

Zong, Y., Huang, J., Sankarasharma, D., Morikawa, T., Fukayama, M., Epstein, J.I., Chada, K.K., and Witte, O.N. (2012). Stromal epigenetic dysregulation is sufficient to initiate mouse prostate cancer via paracrine Wnt signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, E3395-3404.

# Annexes

Annexe 1: Cancer-associated fibroblasts and modulation of the antitumor immune response

Annexe 2: Critical role of tumor microenvironment in shaping NK cell functions: implication of hypoxic stress (Review)

Annexe 3: Granzyme B-activated p53 Interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocytemediated apoptosis

**Annexe 4:** Mechanisms of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis and relationship with the tumor suppressor p53 (Review)



# Cancer-associated Fibroblasts and Modulation of the Antitumor Immune Response

Linda Ziani<sup>1-3</sup>, Salem Chouaib<sup>1-3\*</sup> and Jerome Thiery<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U1186, Villejuif, France

<sup>2</sup>Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

<sup>3</sup>University Paris-Saclay, Faculty of Medicine, Le Kremlin Bicêtre, France

\*Corresponding author: Salem Chouaib, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France, Tel: 33142114211; E-mail: Salem.CHOUAIB@gustaveroussy.fr

Received date: December 12, 2015; Accepted date: December 20, 2015; Published date: December 27, 2015

**Copyright:** © 2015 Ziani L, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

#### Description

During tumor progression, tumor cells proliferate under adverse host conditions and use several survival strategies to block the action of key regulators of the immune response and circumvent anti-tumor defenses. Consequently, the current development of new immunotherapeutic strategies aimed at inducing or optimizing the immune response directed against the tumor and opened the way to new treatments of cancers. Besides the several known classical strategies used by tumor cells to escape to immune surveillance, it should be noted that the evasion of immunosurveillance by tumor cells is also under the control of the tumor microenvironment complexity and plasticity [1,2].

Among the stromal cells, activated fibroblasts, termed cancerassociated fibroblasts (CAFs), play a critical role in the complex process of tumor-stroma interaction. CAFs, one of the prominent stromal cell population in most types of human carcinomas, are a-SMA (alpha-smooth muscle actin) positive, spindle-shaped cells, who closely resemble normal myofibroblasts but express specific markers (ie, FAP (fibroblast-associated protein), PDGFR-β (platelet-derived growth factor)) together with the fibroblastic marker FSP-1 (fibroblast specific protein 1) and vimentin (a mesenchymal marker). CAFs are also characterized by the absence of epithelial (cytokeratin, Ecadherin), endothelial (CD31) and fully differentiated smooth muscle (smoothelin) markers [3]. CAFs differentiate and proliferate in the tumor microenvironment in a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF)-dependent manner from other cell types such as resident fibroblasts, mesenchymal stem cells, endothelial and epithelial cells [4,5]. In the tumor stroma, CAFs interact with tumor cells and secrete several factors such as extracellular matrix proteins (ie, collagen), matrix metallo-proteinases (MMPs), proteoglycans (ie, laminin, fibronectin), chemokines (ie, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL6, CXCL12/SDF1, CCL2 and CCL5), vascularisation promoting factors (ie, PDGF and VEGF) and other proteins which affect tumor cells proliferation, invasiveness, survival and stemness (ie, TGF-B, EGF, HGF, FGF, PGE2) [5]. Consequently, CAFs have been involved in tumor growth, angiogenesis, cancer stemness, extracellular matrix (ECM) remodelling, tissue invasion, metastasis and even chemoresistance [6,7].

During the past few years, these activated tumor-associated fibroblasts have also been involved in the modulation of the antitumor immune response by the secretion of immunosuppressive and pro-inflammatory factors (ie, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IL10...), chemokines (ie, CXCL12, CCL2...) and chemical mediators (ie, PGE2...) in the tumor microenvironment. As such, CAFs can potentially affect both innate and adaptive antitumor immune response [8,9]. For example, the secretion of CXCL12/SDF1 and CCL2/MCP-1 by CAFs is potentially involved in macrophages attraction in the tumor microenvironment and in their differentiation into a M2 immunosuppressive phenotype [10]. CAF secretion of chemokines can also recruit immunosuppressive myeloid-derived suppressive cells (MDSC) population to the tumor [11]. The secretion of TGF- $\beta$  by CAFs potentially affects dendritic cells biology by inhibiting their migration, maturation and antigen presentation capabilities, increases the numbers of regulatory T cells (Tregs) within the tumor microenvironment through the induction of FOXP3 expression [12] and interferes with cytotoxic T lymphocytes (CTL) function and frequency within the tumor [13]. The secretion of TGF- $\beta$  by CAFs can also attenuate IFN-y production by natural killer (NK) cells [14], as well as the expression of NK-activating receptors including NKG2D, NKp30 and NKp44 [12]. Similarly, the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) by CAFs may affect dendritic function and increase the infiltration of Tregs and MDSC within the tumor [15]. Moreover, the secretion of prostaglandin E2 (PGE2) can decrease the expression of the activator receptor NKG2D on NK cells surface (which is also the case for indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) secretion by CAFs) [16] and induces FOXP3 expression in Tregs [17]. Nevertheless, further studies are clearly needed to fully elucidate the complex role of CAFs in the complex tumor immunosuppressive network.

Altogether, these findings highlight the action of CAFs on various levels of the antitumor immune response within the tumor microenvironment. Thus, combination therapy co-targeting CAFs and tumor cells or other immune check points (ie, PDL1, CTLA4) should represent a significant benefit in terms of tumor immunotherapy.

#### Acknowledgement

The authors are supported by the "Ligue Nationale contre le Cancer" (LNCC-Equipe Labélissée), the "Association pour la Recherche contre le Cancer" (ARC) and INSERM. L.Z. is supported by a PhD training fellowship from the "Ligue Nationale contre le Cancer" (LNCC).

#### References

- Hasmim M, Messai Y, Ziani L, Thiery J, Bouhris JH, et al. (2015) Critical role of tumor microenvironment in shaping nk cell functions: implication of hypoxic stress. Front Immunol 6: 482.
- Noman MZ, Hasmim M, Messai Y, Terry S, Kieda C, et al. (2015) Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. Am J Physiol Cell Physiol 309: C569-C579.

- 3. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW (2010) Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. Semin Cell Dev Biol 21: 33-39.
- 4. Augsten M (2014) Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. Front Oncol 4: 62.
- Shimoda M, Mellody KT, Orimo A (2010) Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. Semin Cell Dev Biol 21: 19-25.
- Valcz G, Sipos F, Tulassay Z, Molnar B, Yagi Y (2014) Importance of carcinoma-associated fibroblast-derived proteins in clinical oncology. J Clin Pathol 67: 1026-1031.
- 7. Ohlund D, Elyada E, Tuveson D (2014) Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. J Exp Med 211: 1503-1523.
- 8. Harper J, Sainson RC (2014) Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. Semin Cancer Biol 25: 69-77.
- Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, et al. (2010) Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. Science 330: 827-830.
- Comito G, Giannoni E, Segura CP, Barcellos-de-Souza P, Raspollini MR, et al. (2014) Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. Oncogene 33: 2423-2431.
- 11. Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, et al. (2015) Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. Front Oncol 5: 63.

- 12. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limon P (2010) The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. Nat Rev Immunol 10: 554-567.
- Thomas DA, Massague J (2005) TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. Cancer Cell 8: 369-380.
- 14. Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA (2005) Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. Nat Immunol 6: 600-607.
- Voron T, Marcheteau E, Pernot S, Colussi O, Tartour E, et al. (2014) Control of the immune response by pro-angiogenic factors. Front Oncol 4: 70.
- Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, et al. (2009) Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 106: 20847-20852.
- Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, et al. (2005) Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. Cancer Res 65: 5211-5220.

Page 2 of 2





## Critical role of tumor microenvironment in shaping NK cell functions: implication of hypoxic stress

Meriem Hasmim<sup>1</sup>, Yosra Messai<sup>1</sup>, Linda Ziani<sup>1</sup>, Jerome Thiery<sup>1</sup>, Jean-Henri Bouhris<sup>1,2</sup>, Muhammad Zaeem Noman<sup>1</sup> and Salem Chouaib<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U 1186, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Gustave Roussy Campus, Villejuif, France, <sup>2</sup> Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Gustave Roussy Campus, Villejuif, France

#### **OPEN ACCESS**

#### Edited by:

Susana Larrucea, BioCruces Health Research Institute, Spain

#### Reviewed by:

Stephan Gasser, National University of Singapore, Singapore Kamalakannan Rajasekaran, Blood Research Institute, USA

#### \*Correspondence:

Salem Chouaib, INSERM U1186, Gustave Roussy Campus – PR1, 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif 94805, France salem.chouaib@gustaveroussy.fr

#### Specialty section:

This article was submitted to NK Cell Biology, a section of the journal Frontiers in Immunology

> Received: 15 July 2015 Accepted: 04 September 2015 Published: 23 September 2015

#### Citation:

Hasmim M, Messai Y, Ziani L, Thiery J, Bouhris J-H, Noman MZ and Chouaib S (2015) Critical role of tumor microenvironment in shaping NK cell functions: implication of hypoxic stress. Front. Immunol. 6:482. doi: 10.3389/fimmu.2015.00482 Blurring the boundary between innate and adaptive immune system, natural killer (NK) cells, a key component of the innate immunity, are recognized as potent anticancer mediators. Extensive studies have been detailed on how NK cells get activated and recognize cancer cells. In contrast, few studies have been focused on how tumor microenvironment-mediated immunosubversion and immunoselection of tumor-resistant variants may impair NK cell function. Accumulating evidences indicate that several cell subsets (macrophages, myeloid-derived suppressive cells, T regulatory cells, dendritic cells, cancer-associated fibroblasts, and tumor cells), their secreted factors, as well as metabolic components (i.e., hypoxia) have immunosuppressive roles in the tumor microenvironment and are able to condition NK cells to become anergic. In this review, we will describe how NK cells react with different stromal cells in the tumor microenvironment. This will be followed by a discussion on the role of hypoxic stress in the regulation of NK cell functions. The aim of this review is to provide a better understanding of how the tumor microenvironment impairs NK cell functions, thereby limiting the use of NK cell-based therapy, and we will attempt to suggest more efficient tools to establish a more favorable tumor microenvironment to boost NK cell cytotoxicity and control tumor progression.

#### Keywords: HIF, microenvironment, solid tumors, natural killer cells, immune suppression

#### Introduction

Natural killer (NK) cells are lymphoid cells that are considered to be major innate effector cells. They are endowed with a natural ability to kill tumor cells and infected cells (1). NK cell lytic functions are regulated by a balance of activating and inhibiting signals originating from membrane receptors (1). Despite their effective antitumor activity, their contribution in controlling solid tumor progression remains elusive. The immunosuppressive tumor microenvironment is undoubtedly involved in tumor evasion from NK cell-mediated killing through several cellular and metabolic factors. Immune and stromal cells as well as the hypoxic stress inside the tumor microenvironment are known to be negative regulators of NK cell infiltration into solid tumors and cytotoxicity (1). Tumor cells themselves develop several strategies to evade NK cell-mediated killing. In this regard, hypoxic stress

through its ability to induce tumor resistance and to regulate the differentiation and function of immune-suppressive cells plays a determinant role in shaping the NK cell phenotype and function.

In this review, we propose an insight on how tumor microenvironment inhibits NK cell functions and how this may impact the therapeutic use of NK cells in anticancer treatments.

#### Cell-Mediated Immune Suppression Toward NK Cells in the Tumor Microenvironment

The tumor microenvironment is a complex network of tumor cells, immune cells, stromal cells, and extracellular matrix accomplishing proliferation, migration, and dissemination of tumor cells. The immune cell subset comprises CD8<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells, NK cells, and myeloid cells [dendritic cells (DCs), M2-macrophages, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)]. Despite the recognized role of NK cells in clearing circulating tumor cells (leukemia cells, metastatic cells) (2–4), the antitumor functions of NK cells in solid tumors are frequently mentioned due to the more favorable prognosis associated with higher NK cell infiltration in some type of cancers (5), the inverse correlation between natural cytotoxic activity and cancer incidence (6), or the faster tumor growth in NK cell-depleted mouse models (7–9).

Natural killer cells enter solid tumor site by extravasations through tumor vasculature (10). CXCR3 is a major chemokine receptor involved in NK cell migration toward tumor following a gradient of the tumor-derived chemokine (C-X-C motif) ligands CXCL9, 10, and 11 (11, 12). In particular, increased CXCL10 expression in melanoma tumors results in increased infiltration of adoptively transferred CXCR3-positive expanded NK cells, reflecting the role of CXCL10-induced chemoattraction (12). However, infiltrated NK cells often display a suppressed phenotype inside solid tumors. Accumulating evidence indicates that tumor-residing cells as well as a series of microenvironmental factors are endowed with suppressive properties that affect NK cell reactivity and inhibit their functions (**Figure 1**).

#### Macrophage Polarization Regulates NK Cell-Mediated Cytotoxicity

Within the tumoral tissue, macrophages and other myeloid cells constitute a major component of the immune infiltrate (13, 14). They differentiate into tumor-associated macrophages (TAM) with expression of TAM markers such as CD206 (15). Exposure of TAM to tumor-derived cytokines such as IL-4, IL-10, IL-13, and M-CSF is able to convert them into polarized type II or M2 macrophages with immune-suppressive activities resulting in tumor progression (15). M2-polarized macrophages appear to contribute to immune suppression through the production of immunosuppressive factors such as IL-10 and TGF- $\beta$  (16). Recently, the role of myeloid cells including macrophages in immunosuppression of NK cells has been better understood by the involvement of A2AR receptors (17). Myeloid-selective deletion of A2ARs significantly activates macrophages by favoring M1 polarization, reduces lung metastasis, and increases CD44 expression on tumor-associated NK cells and T cells as well as numbers and activation of NK cells and antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells in lung infiltrates (17). In a xenografted lung carcinoma model, increased expression of surfactant protein-A (SP-A) was reported to be associated with reduced tumor growth and increased M1-TAM and NK cell recruitment and activation at the tumor site (18).

# Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress NK Cell Activity

Myeloid-derived suppressor cells represent additional myeloid subsets involved in tumor-induced immunosuppression (19). MDSCs comprise immature macrophages, granulocytes, and DCs. Their expansion and immunosuppressive functions are well documented in tumor-bearing mice and cancer patients. As such, the NK cell activity was found to be inversely correlated with MDSC expansion (20, 21). In addition, MDSC-mediated inhibition of NK cells was found to be cell contact dependent via membrane-bound transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) on MDSC (21) or inhibition of perforin and signal transducer and activator of transcription 5 (Stat5) activity in NK cells (20). MDSC from patients with hepatocarcinoma also show inhibitory effects on autologous NK cells after coculture (22). This inhibition was also found to be cell contact dependent and to involve blocking of the activating receptor NKp30 on NK cells (22).

#### CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Regulatory Cells Inhibit NK Cell Cytolytic Functions

T regulatory cells (Treg) are well described for their immunosuppressive functions (23). Studies performed by Trzonkowski et al. (24) and Xu et al. (25) report direct inhibitory effects of Treg on NK cell cytolytic functions and expression of the CD69 activation marker following *in vitro* cocultures. These studies indicate that the production of TGF- $\beta$  by Treg is at least one mechanism of Treg-mediated NK cell inhibition. *In vivo*, Treg depletion was shown to increase NK cell proliferation by a mechanism involving IL-15R $\alpha$  expression on DCs (26). In a murine model, such depletion was also shown to favor NKG2D-mediated tumor rejection (27).

#### Dendritic Cells Modulate NK Cell Cytotoxicity

The incrimination of TGF- $\beta$  in the modulation of NK cell cytotoxicity is also reported when NK cells are cocultured with DCs. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) phosphorylation in DCs was reported to be associated with increased secretion of TGF- $\beta$ , which inhibited NK cell activity, and inhibition of TGF-β restored NK cell functions (28). TGF-β production by DCs can be induced by coculture of immature DC with lung carcinoma cells (29) or by stimulation with LPS (30). Secretion of IL-6 and IL-10 by DC has also been incriminated in dendritic cell-mediated NK cell inhibition (31). Nevertheless, some reports show that DC can also activate NK cell functions. IL-15-stimulated DCs acquire the ability to increase surface expression of the NK cell-activating receptors NKp30 and NKp46, which is associated with an increased tumor target killing (32). This activation is cell contact dependent and required membrane-bound IL-15 on DC. DCs were also reported to induce NK cell proliferation and to activate NKp30 receptor-signaling in NK cells (33).



NK cells in the tumor microenvironment.  $\nearrow$ : secretion; =: membrane-bound; (+): activation; (–): inhibition.

# Cancer-Associated Fibroblasts Decrease NK Cell-Mediated Cytotoxicity

Among the stromal cells, modified/activated fibroblasts, often termed cancer-associated fibroblasts (CAFs), are considered to play a central role in the complex process of tumor–stroma interaction. CAFs, the prominent stromal cell population in most types of human carcinomas, are  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth muscle actin) positive, spindle-shaped cells, which closely resemble normal myofibroblasts but express specific markers [i.e., FAP (fibroblast-associated protein), FSP-1 (fibroblast specific protein 1), and PDGFR- $\beta$  (platelet-derived growth factor)] together with vimentin (a mesenchymal marker) and the absence of epithelial (cytokeratin, E-cadherin) and fully differentiated smooth muscle (smoothelin) markers (34–36). CAFs differentiate in the tumor

microenvironment in a TGF- $\beta$ -dependent manner from other cell types such as resident fibroblasts, mesenchymal stem cells, and endothelial and epithelial cells (37, 38). In the tumor stroma, CAFs produce and secrete several factors such as extracellular matrix proteins (i.e., collagen I, III, IV), matrix metalloproteinases (MMPs), proteoglycans (i.e., laminin, fibronectin), chemokines (i.e., CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL6, CXCL12/SDF1, CCL2, and CCL5), vascularization promoting factors (i.e., PDGF and VEGF), and other proteins that affect tumor cells' proliferation, invasiveness, and survival (i.e., TGF- $\beta$ , EGF, HGF, and FGF) (39). Consequently, CAFs have been involved in tumor growth, angiogenesis, tissue invasion, and metastasis (40).

During the past few years, these activated tumor-associated fibroblasts have also been involved in the modulation of the

antitumor immune response, especially by the secretion of soluble immunosuppressive factors in the tumor microenvironment (TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10) (41). As such, CAFs can potentially affect both innate and adaptive antitumor immune response by increasing the recruitment to tumor of myeloid-derived suppressive cells (MDSC), by decreasing antigen presentation, by increasing the numbers of Tregs, by decreasing T-cell proliferation, cytotoxic T-cell (CTL) function and maturation, or by inhibiting B cell activation and differentiation (41, 42). Different studies also involved CAFs in the modulation of the NK cell functionality. Indeed, the secretion of TGF-β by CAFs could attenuate the expression of NK cell-activating receptors including NKG2D, NKp30, and NKp44 (43, 44). More recently, studies involving melanoma and hepatocellular and colorectal carcinoma-derived fibroblasts have shown that CAFs can decrease NKG2D expression on NK cells surface through the secretion of prostaglandin E2 (PGE2) and/or indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). In parallel, perforin and granzyme B expression (involved in NK cell-mediated killing of target cells) also seem to be decreased by coculture of NK cells with CAFs, affecting their lytic potential (45-47). Altogether, these findings highlight the direct and indirect action of CAFs on various levels of the antitumor immune response and on NK cells antitumor activity within the tumor microenvironment.

# Tumor Cells May Develop Strategies to Evade NK Cell-Mediated Lysis

In many cancers, tumor cells down-regulate surface expression of MHC-I molecules in order to evade CD8-dependent T-cell killing, making them more susceptible to NK cell-dependent killing. Cancer cells can also up-regulate NKG2D ligands following activation of NFkB or Sp transcription factors (48). However, tumor cells also develop various strategies to inhibit NK cell-mediated cytotoxicity. Indeed, NK cells from multiple myeloma patients were shown to constitutively express the inhibitory receptor PD-1, as compared to NK cells from healthy donors, which contributes to NK cell inhibition by multiple myeloma cells (49). When the authors inhibit the PD-1/PD-L1 axis using lenalidomide or a blocking antibody, they restored NK cell lytic functions against tumor cells. In addition, tumor cells secrete a number of immunosuppressive cytokines such as TGF- $\beta$ . In this regard, neuroblastoma cell-derived TGF- $\beta$  has been reported to down-regulate the activating receptor NKp30 (50). Melanoma cells are also able to inhibit the expression of activating NK cell receptors including NKp30, NKp44, and NKG2D, resulting in impairment of NK cell-mediated cytotoxicity (51). This inhibitory effect is mediated via the production of IDO and PGE2 by melanoma cells. Tumor cells may release soluble NKG2D ligands through proteolytic cleavage, resulting in down-regulation of NKG2D and impairment of NK cell lytic functions (52, 53). The inhibitory consequences of releasing soluble NK cell receptor ligands may not be systematic. Indeed, NKp30 activation by tumor-released vesicles containing HLA-Bassociated transcript 3 (BAT3), a ligand for NKp30, was reported (54). Very recently, Deng et al. demonstrated that shedding of the NKG2D ligand MULT1 results in NK cell activation and increased surface expression of NKG2D (55). As suggested by

the authors, the differential affinity of MULT1 (high-affinity NKG2D ligand) and MICA/B (low-affinity NKG2D ligand) for NKG2D may explain this discrepancy. Recently, Nanbakhsh et al. reported that the induction of c-myc in leukemic cells resistant to cytarabine resulted in up-regulation of NKG2D ligands (56). Since deregulated expression of c-myc is associated with many cancers in human, it raises the question of the expression of NK cell-activating ligands on c-myc-altered solid tumors. We and others have also provided evidence indicating a role of HIF factors in tumor resistance to NK cell-mediated lysis, which is further detailed in Section "Consequences of Hypoxia-Induced HIF Stabilization on NK Cell Functions."

#### Consequences of Hypoxia-Induced HIF Stabilization on NK Cell Functions

Microenvironmental hypoxia is a prominent feature of solid tumors and is involved in fostering the neoplastic process and in the modulation of immune reactivity (57). It results from inadequacies between the tumor microcirculation and the oxygen demands of the growing tumor mass, which leads to a lowering of oxygen partial pressure and a metabolic switch toward glycolysis (58). Tumor hypoxia is a negative prognostic and predictive factor due to many effects on the selection of hypoxia-surviving clones (59), activation of the expression of genes involved in apoptosis inhibition (60), angiogenesis (61), invasiveness and metastasis (62), epithelial-to-mesenchymal transition (63), and loss of genomic stability (64). Accumulating evidences indicate that tumor hypoxia is also involved in the loss of immune reactivity either by decreasing tumor cell sensitivity to cytotoxic effectors or by promoting immunosuppressive mechanisms (57).

# Cellular Adaptation to Hypoxia Through Hypoxia-Inducible Factors

Cells adapt to hypoxic microenvironment by regulation of hypoxia-inducible family of transcription factors (HIFs). This family comprises three members: HIF-1, HIF-2, and HIF-3. HIF-1 is a heterodimeric protein composed of a constitutively expressed  $\beta$ -subunit and an O<sub>2</sub>-regulated  $\alpha$ -subunit. In the presence of O2, HIF-1α is hydroxylated on proline residue 402 and/or 564 by prolylhydroxylase domain protein 2 (PHD2), resulting in its interaction with the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein, which recruits an E3 ubiquitin-protein ligase that eventually catalyzes poly-ubiquitination of HIF-1α, thereby targeting it for proteasomal degradation (1). Under hypoxic conditions, hydroxylation is inhibited and HIF-1a rapidly accumulates, dimerizes with HIF- $\beta$ , binds to the core DNA-binding sequence 50-RCGTG-30 [R being a purine base (adenine or guanine)] in the promoter region of target genes, recruits coactivators, and activates transcription (65). In addition, oxygen-dependent hydroxylation of asparagine-803 by factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) blocks the interaction of HIF-1 $\alpha$  with the coactivators P300/CBP under normoxic conditions, resulting in suppression of HIF transcriptional activity (66–68). Similar to HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  is also regulated by oxygen-dependent hydroxylation. HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  are structurally similar in their DNA-binding regions and dimerization domains but differ in their transactivation domains. Consistently,

they share many target genes, but each one also regulates a unique set of genes (69). HIF- $3\alpha$  lacks the transactivation domain and may function as an inhibitor of HIF- $1\alpha$  and HIF- $2\alpha$  (70).

#### Hypoxic and Pseudo-Hypoxic Tumor Cells Are Resistant to NK Cell-Mediated Killing

It is now well established that the hypoxic tumor microenvironment favors the emergence of tumor variants with increased metastatic and invasive potential and alters immune reactivity as well (57).

Fink and colleagues reported the inhibition of NK cell cytotoxicity toward liver tumor cell lines under hypoxic conditions, suggesting for the first time that hypoxia is able to confer tumor resistance to NK cell-mediated cytotoxicity (71). Another study demonstrated that hypoxia decreased the expression of MICA (a NKG2D ligand) on osteosarcoma cell surface with a consistent decrease in the susceptibility of these cells to NK cell-mediated cytotoxicity (72). Consistently, HIF-1α knockdown using small interfering RNA increased the expression of cell surface MICA and concomitantly increased the level of soluble MICA. HIF-1 $\alpha$  was also found to be inversely correlated with MIC gene expression, indicating that hypoxia was involved in the inhibition of NK cell reactivity toward tumor cells. Recently, we showed that hypoxiainduced autophagy in tumor cells mediated resistance to CTL (73). In this context, Baginska et al. demonstrated that hypoxia-induced autophagy in tumor cells was also involved in tumor resistance to NK cells via granzyme B degradation in autophagosomes (74).

In the particular context of renal cancer, hypoxic signaling is frequently constitutively active owing to the majority of renal cancers presenting with clear cell carcinoma (ccRCC) histology (75), which is usually associated with mutational or functional inactivation of the VHL gene (76). The VHL pathway targets the hypoxia-inducible factors (HIFs) family of transcription factors, in particular HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ , for ubiquitin-mediated degradation via the proteasome (77). Consequently, VHL inactivation leads to constitutive stabilization of HIFs, a process known as pseudo-hypoxia, and increased expression of HIF target genes. Our group has recently shown that, in VHL-mutated ccRCC cells, HIF-2 stabilization caused by mutated VHL induces upregulation of ITPR1 which is involved in ccRCC resistance to NK cells (78). NK cells were found to induce a contact-dependent autophagy in ccRCC cells that was dependent on ITPR1 expression in tumor cells. Blocking ITPR1 expression in ccRCC cells inhibited NK cell-induced autophagy and suppressed ccRCC resistance to NK cells.

On the contrary, in non-tumoral cells, Luo and colleagues demonstrated that HIF-1 $\alpha$  overexpression in HK-2 cells induces MICA expression and enhances NK cell cytotoxicity toward target cells as well as IFN $\gamma$  secretion by NK cells (79). Antibody blocking experiments using anti-MICA mAb were able to down-regulate NK cell-mediated killing and IFN $\gamma$  secretion toward HIF-1 $\alpha$ -overexpressing HK-2 cells confirming the involvement of MICA in the increased NK cell reactivity.

#### Hypoxia Inhibits NK Cell Functions via HIFs

The specific role of hypoxia and HIFs on NK cells is not well studied.

Balsamo and colleagues showed that NK cells adapt to a hypoxic environment by up-regulating HIF-1 $\alpha$ . They demonstrated that, under hypoxia, NK cells lose their ability to up-regulate the surface expression of the major activating NK-cell receptors (NKp46, NKp30, NKp44, and NKG2D) in response to IL-2 or other activating cytokines (including IL-15, IL-12, and IL-21). These altered phenotypic features correlated with reduced responses to activating signals, resulting in impaired capability of killing infected or tumor target cells. However, hypoxia does not significantly alter the surface density and the triggering function of the Fc- $\gamma$  receptor CD16, thus allowing NK cells to maintain their capability of killing target cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity (80).

Hypoxic primary tumors were shown to provide cytokines and growth factors capable of creating a pre-metastatic niche and a reduction of the cytotoxic functions of NK cells. In fact, Sceneay et al. reported that injection of mice with hypoxic mammary tumor cells resulted in increased CD11b+/Ly6Cmed/Ly6G+ myeloid and CD3<sup>-</sup>/NK1.1<sup>+</sup> immune cell lineages infiltration into the lung and led to increased metastatic burden in mammary and melanoma experimental metastasis models (81). The cytotoxicity of NK cells was significantly decreased, resulting in a reduced antitumor response that allowed metastasis formation in secondary organs to an extent similar to that observed following depletion of NK cells. Sarkar and colleagues confirmed that hypoxia reduced NK cell killing of multiple myeloma cell lines (82). They showed that hypoxia significantly decreased expression of the activating receptor NKG2D by NK cells and of intracellular granzyme B and perforin. Whether HIF factors were able to directly regulate the expression of granzymes genes is not documented, but perforin has been reported not to be a direct target gene of HIF-1 (83).

Despite detailed description of the detrimental effects of hypoxia on NK-cell responses, the underlying molecular mechanisms remain unclear. In particular, whether HIF or other hypoxia-related factors are able to directly control NK cell receptor expression remain to be clarified.

# Indirect Consequences of Hypoxic Stress on NK Cell Cytotoxic Functions

Despite the direct consequences of hypoxic stress on NK cells, intratumoral hypoxia is also involved in increased tumor infiltration by Treg and MDSC and in M2-polarization (57), which are cellular subsets that negatively regulate NK cell lytic functions (see Cell-Mediated Immune Suppression Toward NK Cells in the Tumor Microenvironment). Hypoxic stress is also involved in increased expression and secretion by tumor cells of NK cell-inhibiting cytokines such as TGF- $\beta$  (84, 85). Of note, NK cell adhesion on hypoxic endothelial cells was reported to be not altered (86), but NK cell infiltration into hypoxic tumors has not been extensively studied.

#### NK Cell: A Role in Tumor Immunoediting

The major focus of immunotherapy approaches has been enhancing the effectiveness of host antitumor immunity. However, while accumulating evidences indicate that tumor microenvironment might evade the innate host immune response to ensure tumor development and survival (58, 87), NK cells have also been reported to play a role in the selection of tumor-resistant and tumor-tolerant cells and therefore to shape tumor microenvironment (88). While the mechanisms of CTL-induced tumor editing are well known (89), only limited knowledge on how NK cells induce tumor editing is available. In this regard, the involvement of NK cells in immune editing has been studied in relation to NKG2D and DNAM1 (90, 91). Guillerey and Smyth have elegantly demonstrated the NK cell activity in the cancer immune editing process with particular emphasis on the elimination and escape phases (92). NK cells have been also shown to kill immature DC because of their low amount of surface human leukocyte antigen (HLA) class I molecules (33) and therefore impact the quality of adaptive immune response. In this regard, Ghadially et al. have reported data indicating that in the absence of NKp46, graft-versus-host disease (GVHD) is greatly exacerbated, resulting in rapid mortality of the transplanted animals (93). Furthermore, these authors have demonstrated that the exacerbated GVHD is the result of an altered ability of immune cells to respond to stimulation by immature DCs (94). Buchser et al. have shown that classic cytolytic cells, including NK cells, can often promote survival and autophagy in target cells (95). These authors provided evidence indicating that NK cells are a primary mediator of autophagy in tumor target cells by a mechanism involving cytokines (IL-10, IL-2, IFNy) and that cell-to-cell contact strongly enhanced lymphocyte-mediated autophagy. The authors suggested that the NK cell-mediated autophagy promotes cancer cell survival and may represent an important target for development of novel therapies.

#### NK Cell-Based Immunotherapies in the Context of Tumor Microenvironment Complexity and Heterogeneity

Natural killer cell-based immunotherapies have the advantage of circumventing antigen recognition restriction since NK cells do not need antigen recognition to kill tumor targets. In this context, NK cell infusion has been useful in leukemic patients, probably due to their primary location being the blood. Indeed, most of hematological malignancies display an autologous NK cell deficiency specifically in myeloid diseases. Autologous NK cells do not control acute myeloid leukemia (AML) blasts and several mechanisms have been hypothesized: down-regulation of the ligands for NK-cell activating receptors or up-regulation of NK cell inhibitory receptors (96). Allogeneic NK cells do not bear this deficiency and have demonstrated their ability to kill AML blasts targets. In this context, the killer Ig-like receptor (KIR)-ligand mismatch is considered fundamental for their antitumor effects (97, 98, 99). Modulating the immune reconstitution following allogeneic transplantation with NK cells is a potential powerful tool to increase the graft versus leukemia (GvL) effect against AML blasts and tumor cells (100). NK cells do recover early following allogeneic transplantation and exert cytotoxicity through MHC unrestricted killing. High numbers of allogeneic circulating NK cells improved remission duration in patients with leukemia and consolidate engraftment following haploidentical transplants (101).

On the other hand, the therapeutic potential of NK cells in solid tumors is not yet clearly established. However, preclinical studies support the antitumor activity of NK cells against solid tumors (102). Phase I and phase II clinical trials based on adoptive transfer of irradiated NK cell lines or allogeneic NK cells have been made in breast, ovarian, melanoma, and renal cancer patients (98, 103). These trials revealed mild and transient toxicities following NK-92 infusion and some severe syndromes following allogeneic NK cell administration. Further studies are still needed to increase NK cell persistence and expansion.

Moreover, producing sufficient amounts of allogeneic NK cells for clinical applications remain a technical challenge in cell therapy programs despite their useful and safe infusion 10 years ago (104). Dampening negative regulators of NK cell lytic functions should also be explored, in particular in the context of solid tumors. Strategies aimed at inhibiting NK cell suppressors such as TGF-β, expansion of immunosuppressive cells, and expression of inhibitory checkpoints should be considered. In particular, targeting HIF-1 $\alpha$  by antisense plasmid in xenografted mice led to NK cell-dependent tumor rejection (105). Various anticancer drugs have been shown to inhibit HIFs (106, 107). We believe that pharmacologic manipulation of hypoxic signaling will result in increased target killing by effector cells and in general improving of antitumoral immunotherapy. Whether the suppression of hypoxia may be a promising strategy that is selective for facilitating immunotherapeutic efficacy in cancer patients is at present investigated. Nevertheless, a better understanding of functionally distinct KIR or NK cell receptor subsets within NK cell population is still needed for designing optimal immunotherapy based on NK cell administration or reactivation.

#### Conclusion

During the last few years, cancer immunotherapy has emerged as a safe and effective alternative to cancers that do not respond to classical treatments including those types with high aggressiveness. New immune modulators like cytokines, blockers of CTLA4/CD28 and PD-1/PD-L1 interactions, or adoptive cell therapy have been developed and approved to treat solid tumors and hematological malignant diseases. In these scenarios, cytotoxic lymphocytes mainly CTLs and NK cells are the ultimate responsible for killing the cancer cells and eradicating the tumor. Many mechanisms have been proposed for the functional inactivation of tumor-associated NK cells. Thus, the definition of tumor microenvironment-related immunosuppressive factors, along with the identification of new classes of tissue-residing NK cell-like innate lymphoid cells, represents key issues to design effective NK-cell-based therapies for solid tumors.

#### Acknowledgments

The authors are supported by the Ligue contre le Cancer.

#### References

- 1. Moretta L, Montaldo E, Vacca P, Del Zotto G, Moretta F, Merli P, et al. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol* (2014) **164**:253–64. doi:10.1159/000365632
- Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* (2009) 113:3119–29. doi:10.1182/blood-2008-06-164103
- 3. Wiltrout RH, Herberman RB, Zhang S, Chirigos MA, Ortaldo JR, Green KM, et al. Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *J Immunol* (1985) **134**:4267–75.
- Yang Q, Goding SR, Hokland ME, Basse PH. Antitumor activity of NK cells. Immunol Res (2006) 36:13–25. doi:10.1385/IR:36:1:13
- Rusakiewicz S, Semeraro M, Sarabi M, Desbois M, Locher C, Mendez R, et al. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* (2013) 73:3499–510. doi:10.1158/0008-5472. CAN-13-0371
- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* (2000) 356:1795–9. doi:10.1016/ S0140-6736(00)03231-1
- Dithmar SA, Rusciano DA, Armstrong CA, Lynn MJ, Grossniklaus HE. Depletion of NK cell activity results in growth of hepatic micrometastases in a murine ocular melanoma model. *Curr Eye Res* (1999) 19:426–31. doi:10.1076/ceyr.19.5.426.5294
- Kataoka H, Uchino H, Iwamura T, Seiki M, Nabeshima K, Koono M. Enhanced tumor growth and invasiveness in vivo by a carboxyl-terminal fragment of alpha1-proteinase inhibitor generated by matrix metalloproteinases: a possible modulatory role in natural killer cytotoxicity. *Am J Pathol* (1999) 154:457–68. doi:10.1016/S0002-9440(10)65292-3
- Mailloux AW, Clark AM, Young MR. NK depletion results in increased CCL22 secretion and Treg levels in Lewis lung carcinoma via the accumulation of CCL22-secreting CD11b+CD11c+ cells. *Int J Cancer* (2010) 127:2598–611. doi:10.1002/ijc.25281
- Nannmark U, Basse P, Johansson BR, Kuppen P, Kjergaard J, Hokland M. Morphological studies of effector cell-microvessel interactions in adoptive immunotherapy in tumor-bearing animals. *Nat Immun* (1996) 15:78–86.
- Wennerberg E, Pfefferle A, Ekblad L, Yoshimoto Y, Kremer V, Kaminskyy VO, et al. Human anaplastic thyroid carcinoma cells are sensitive to NK cell-mediated lysis via ULBP2/5/6 and chemoattract NK cells. *Clin Cancer Res* (2014) 20:5733–44. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0291
- Wennerberg E, Kremer V, Childs R, Lundqvist A. CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo. *Cancer Immunol Immunother* (2015) 64:225–35. doi:10.1007/s00262-014-1629-5
- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. J Pathol (2002) 196:254–65. doi:10.1002/path.1027
- Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* (2012) 12:253–68. doi:10.1038/ nri3175
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* (2002) 23:549–55. doi:10.1016/ S1471-4906(02)02302-5
- Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res* (2012) 4:376–89.
- Cekic C, Day YJ, Sag D, Linden J. Myeloid expression of adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. *Cancer Res* (2014) 74:7250–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3583
- Mitsuhashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, et al. Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* (2013) 182:1843–53. doi:10.1016/j.ajpath.2013.01.030

- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol (2009) 9:162–74. doi:10.1038/nri2506
- Liu C, Yu S, Kappes J, Wang J, Grizzle WE, Zinn KR, et al. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood* (2007) 109:4336–42. doi:10.1182/blood-2006-09-046201
- Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGFbeta 1. *J Immunol* (2009) 182:240–9. doi:10.4049/jimmunol.182.1.240
- Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekelashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, et al. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* (2009) 50:799–807. doi:10.1002/hep.23054
- Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol (2006) 6:295–307. doi:10.1038/nri1806
- 24. Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszuk A, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* (2004) **112**:258–67. doi:10.1016/j.clim.2004.04.003
- Xu L, Tanaka S, Bonno M, Ido M, Kawai M, Yamamoto H, et al. Cord blood CD4(+)CD25(+) regulatory T cells fail to inhibit cord blood NK cell functions due to insufficient production and expression of TGF-beta1. *Cell Immunol* (2014) **290**:89–95. doi:10.1016/j.cellimm.2014.05.007
- Terme M, Chaput N, Combadiere B, Ma A, Ohteki T, Zitvogel L. Regulatory T cells control dendritic cell/NK cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting CD4+ self-reactive T cells. *J Immunol* (2008) 180:4679–86. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4679
- Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. J Immunol (2006) 176:1582–7. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1582
- Sarhan D, Palma M, Mao Y, Adamson L, Kiessling R, Mellstedt H, et al. Dendritic cell regulation of NK-cell responses involves lymphotoxin-alpha, IL-12 and TGF-beta. *Eur J Immunol* (2015) 45(6):1783–93. doi:10.1002/ eji.201444885
- Dumitriu IE, Dunbar DR, Howie SE, Sethi T, Gregory CD. Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* (2009) 182:2795–807. doi:10.4049/jimmunol.0712671
- Zhang X, Huang H, Yuan J, Sun D, Hou WS, Gordon J, et al. CD4-8- dendritic cells prime CD4+ T regulatory 1 cells to suppress antitumor immunity. *J Immunol* (2005) 175:2931–7. doi:10.4049/jimmunol.175.5.2931
- Perez-Martinez A, Iyengar R, Gan K, Chotsampancharoen T, Rooney B, Holladay M, et al. Blood dendritic cells suppress NK cell function and increase the risk of leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2011) 17:598–607. doi:10.1016/j. bbmt.2010.10.019
- Anguille S, Van Acker HH, Van Den Bergh J, Willemen Y, Goossens H, Van Tendeloo VF, et al. Interleukin-15 dendritic cells harness NK cell cytotoxic effector function in a contact- and IL-15-dependent manner. *PLoS One* (2015) 10:e0123340. doi:10.1371/journal.pone.0123340
- Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* (2002) 195:343–51. doi:10.1084/jem.20011149
- Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol* (2010) 21:33–9. doi:10.1016/j. semcdb.2009.10.010
- Rasanen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* (2010) 316:2713–22. doi:10.1016/j.yexcr.2010.04.032
- Polanska UM, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. J Cell Physiol (2013) 228:1651–7. doi:10.1002/jcp.24347
- Madar S, Goldstein I, Rotter V. 'Cancer associated fibroblasts' more than meets the eye. *Trends Mol Med* (2013) 19:447–53. doi:10.1016/j. molmed.2013.05.004
- Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol* (2014) 4:62. doi:10.3389/ fonc.2014.00062

- Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol* (2010) 21:19–25. doi:10.1016/j.semcdb.2009.10.002
- Valcz G, Sipos F, Tulassay Z, Molnar B, Yagi Y. Importance of carcinoma-associated fibroblast-derived proteins in clinical oncology. *J Clin Pathol* (2014) 67:1026–31. doi:10.1136/jclinpath-2014-202561
- Harper J, Sainson RC. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin Cancer Biol* (2014) 25:69–77. doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.005
- Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science* (2010) **330**:827–30. doi:10.1126/ science.1195300
- Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limon P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol* (2010) 10:554–67. doi:10.1038/nri2808
- Park YP, Choi SC, Kiesler P, Gil-Krzewska A, Borrego F, Weck J, et al. Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the gammac cytokines and TGF-beta1. *Blood* (2011) 118:3019–27. doi:10.1182/blood-2011-04-346825
- Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, et al. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106:20847–52. doi:10.1073/pnas.0906481106
- Li T, Yang Y, Hua X, Wang G, Liu W, Jia C, et al. Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. *Cancer Lett* (2012) 318:154–61. doi:10.1016/j.canlet.2011.12.020
- Li T, Yi S, Liu W, Jia C, Wang G, Hua X, et al. Colorectal carcinoma-derived fibroblasts modulate natural killer cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Med Oncol* (2013) 30:663. doi:10.1007/s12032-013-0663-z
- Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:413–41. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095951
- Benson DM Jr, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* (2010) 116:2286–94. doi:10.1182/blood-2010-02-271874
- Castriconi R, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Castellano A, Locatelli F, et al. Neuroblastoma-derived TGF-beta1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells. *J Immunol* (2013) 190:5321–8. doi:10.4049/jimmunol.1202693
- Pietra G, Manzini C, Rivara S, Vitale M, Cantoni C, Petretto A, et al. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res* (2012) 72:1407–15. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2544
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* (2002) 419:734–8. doi:10.1038/nature01112
- Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* (2006) 239:22–30. doi:10.1016/j.cellimm.2006.03.002
- Pogge Von Strandmann E, Simhadri VR, Von Tresckow B, Sasse S, Reiners KS, Hansen HP, et al. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* (2007) 27:965–74. doi:10.1016/j.immuni.2007.10.010
- Deng W, Gowen BG, Zhang L, Wang L, Lau S, Iannello A, et al. Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science* (2015) 348:136–9. doi:10.1126/science.1258867
- Nanbakhsh A, Pochon C, Mallavialle A, Amsellem S, Bourhis JH, Chouaib S. c-Myc regulates expression of NKG2D ligands ULBP1/2/3 in AML and modulates their susceptibility to NK-mediated lysis. *Blood* (2014) 123:3585–95. doi:10.1182/blood-2013-11-536219
- Noman MZ, Messai Y, Carre T, Akalay I, Meron M, Janji B, et al. Microenvironmental hypoxia orchestrating the cell stroma cross talk, tumor progression and antitumor response. *Crit Rev Immunol* (2011) 31:357–77. doi:10.1615/CritRevImmunol.v31.i5.10
- Laconi E. The evolving concept of tumor microenvironments. *Bioessays* (2007) 29:738–44. doi:10.1002/bies.20606

- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* (1996) 379:88–91. doi:10.1038/379088a0
- Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, et al. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* (2004) 24:2875–89. doi:10.1128/ MCB.24.7.2875-2889.2004
- Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (2000) 35:71–103. doi:10.1080/10409230091169186
- Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* (2003) 3:347–61. doi:10.1016/ S1535-6108(03)00085-0
- Hill RP, Marie-Egyptienne DT, Hedley DW. Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. Semin Radiat Oncol (2009) 19:106–11. doi:10.1016/j. semradonc.2008.12.002
- Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. Nat Rev Cancer (2008) 8:180–92. doi:10.1038/nrc2344
- 65. Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. Biol Chem (1997) **378**:609–16.
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* (2001) 15:2675–86. doi:10.1101/gad.924501
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* (2002) 16:1466–71. doi:10.1101/ gad.991402
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* (2002) 295:858–61. doi:10.1126/science.1068592
- Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* (2011) 12:9–22. doi:10.1038/nrc3183
- Maynard MA, Evans AJ, Shi W, Kim WY, Liu FF, Ohh M. Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle* (2007) 6:2810–6. doi:10.4161/cc.6.22.4947
- Fink T, Ebbesen P, Koppelhus U, Zachar V. Natural killer cell-mediated basal and interferon-enhanced cytotoxicity against liver cancer cells is significantly impaired under in vivo oxygen conditions. *Scand J Immunol* (2003) 58:607–12. doi:10.1111/j.1365-3083.2003.01347.x
- Yamada N, Yamanegi K, Ohyama H, Hata M, Nakasho K, Futani H, et al. Hypoxia downregulates the expression of cell surface MICA without increasing soluble MICA in osteosarcoma cells in a HIF-1alpha-dependent manner. *Int J Oncol* (2012) 41:2005–12. doi:10.3892/ijo.2012.1630
- Noman MZ, Janji B, Kaminska B, Van Moer K, Pierson S, Przanowski P, et al. Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res* (2011) 71:5976–86. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1094
- Baginska J, Viry E, Berchem G, Poli A, Noman MZ, Van Moer K, et al. Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:17450–5. doi:10.1073/pnas.1304790110
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin (2006) 56:106–30. doi:10.3322/canjclin.56.2.106
- Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* (2007) 13:680s–4s. doi:10.1158/1078-0432. CCR-06-1865
- Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* (2000) 19:4298–309. doi:10.1093/ emboj/19.16.4298
- Messai Y, Noman MZ, Hasmim M, Janji B, Tittarelli A, Boutet M, et al. ITPR1 protects renal cancer cells against natural killer cells by inducing autophagy. *Cancer Res* (2014) 74:6820–32. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0303
- 79. Luo L, Lu J, Wei L, Long D, Guo JY, Shan J, et al. The role of HIF-1 in up-regulating MICA expression on human renal proximal tubular

epithelial cells during hypoxia/reoxygenation. BMC Cell Biol (2010) 11:91. doi:10.1186/1471-2121-11-91

- Balsamo M, Manzini C, Pietra G, Raggi F, Blengio F, Mingari MC, et al. Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC. *Eur J Immunol* (2013) 43:2756–64. doi:10.1002/eji.201343448
- Sceneay J, Chow MT, Chen A, Halse HM, Wong CS, Andrews DM, et al. Primary tumor hypoxia recruits CD11b+/Ly6Cmed/Ly6G+ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res* (2012) 72:3906–11. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3873
- Sarkar S, Germeraad WT, Rouschop KM, Steeghs EM, Van Gelder M, Bos GM, et al. Hypoxia induced impairment of NK cell cytotoxicity against multiple myeloma can be overcome by IL-2 activation of the NK cells. *PLoS One* (2013) 8:e64835. doi:10.1371/journal.pone.0064835
- Finlay DK, Rosenzweig E, Sinclair LV, Feijoo-Carnero C, Hukelmann JL, Rolf J, et al. PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. J Exp Med (2012) 209:2441–53. doi:10.1084/jem.20112607
- Hasmim M, Noman MZ, Messai Y, Bordereaux D, Gros G, Baud V, et al. Cutting edge: hypoxia-induced Nanog favors the intratumoral infiltration of regulatory T cells and macrophages via direct regulation of TGF-beta1. *J Immunol* (2013) 191:5802–6. doi:10.4049/jimmunol.1302140
- Matsuoka J, Yashiro M, Doi Y, Fuyuhiro Y, Kato Y, Shinto O, et al. Hypoxia stimulates the EMT of gastric cancer cells through autocrine TGFbeta signaling. *PLoS One* (2013) 8:e62310. doi:10.1371/journal.pone.0062310
- Maurus CF, Schmidt D, Schneider MK, Turina MI, Seebach JD, Zund G. Hypoxia and reoxygenation do not upregulate adhesion molecules and natural killer cell adhesion on human endothelial cells in vitro. *Eur J Cardiothorac Surg* (2003) 23:976–83. doi:10.1016/S1010-7940(03)00146-5
- 87. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* (2013) **14**:1014–22. doi:10.1038/ni.2703
- Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol* (2014) 44:1582–92. doi:10.1002/eji.201344272
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* (2011) 331:1565-70. doi:10.1126/science.1203486
- Smyth MJ, Wallace ME, Nutt SL, Yagita H, Godfrey DI, Hayakawa Y. Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer. J Exp Med (2005) 201:1973–85. doi:10.1084/ jem.20042280
- Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, et al. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. J Exp Med (2008) 205:2959–64. doi:10.1084/jem.20081611
- Guillerey C, Smyth MJ. NK cells and cancer immunoediting. Curr Top Microbiol Immunol (2015). doi:10.1007/82\_2015\_446
- Ghadially H, Ohana M, Elboim M, Gazit R, Gur C, Nagler A, et al. NK cell receptor NKp46 regulates graft-versus-host disease. *Cell Rep* (2014) 7:1809–14. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.011
- Elboim M, Gazit R, Gur C, Ghadially H, Betser-Cohen G, Mandelboim O. Tumor immunoediting by NKp46. *J Immunol* (2010) 184:5637–44. doi:10.4049/jimmunol.0901644
- Buchser WJ, Laskow TC, Pavlik PJ, Lin HM, Lotze MT. Cell-mediated autophagy promotes cancer cell survival. *Cancer Res* (2012) 72:2970–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3396

- Khaznadar Z, Henry G, Setterblad N, Agaugue S, Raffoux E, Boissel N, et al. Acute myeloid leukemia impairs natural killer cells through the formation of a deficient cytotoxic immunological synapse. *Eur J Immunol* (2014) 44:3068–80. doi:10.1002/eji.201444500
- Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Martelli MF, Velardi A. Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* (2005) 17:211–7. doi:10.1016/j.coi.2005.01.007
- Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. J Clin Oncol (2005) 23:3447–54. doi:10.1200/JCO.2005.09.117
- 99. Curti A, Ruggeri L, D'addio A, Bontadini A, Dan E, Motta MR, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood* (2011) 118:3273–9. doi:10.1182/blood-2011-01-329508
- 100. Laport GG, Sheehan K, Baker J, Armstrong R, Wong RM, Lowsky R, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2011) 17:1679–87. doi:10.1016/j. bbmt.2011.05.012
- Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. Immunotherapy (2011) 3:1445–59. doi:10.2217/imt.11.131
- 102. Cho D, Shook DR, Shimasaki N, Chang YH, Fujisaki H, Campana D. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res* (2010) 16:3901–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0735
- 103. Geller MA, Cooley S, Judson PL, Ghebre R, Carson LF, Argenta PA, et al. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* (2011) 13:98–107. doi:10.3 109/14653249.2010.515582
- 104. Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, Chaput N, Zitvogel L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* (2008) 9:486–94. doi:10.1038/ni1580
- 105. Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther* (2001) 8:638–45. doi:10.1038/ sj.gt.3301388
- Patiar S, Harris AL. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapy target. *Endocr Relat Cancer* (2006) 13(Suppl 1):S61–75. doi:10.1677/ erc.1.01290
- Scholz CC, Taylor CT. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. Curr Opin Pharmacol (2013) 13:646–53. doi:10.1016/j.coph.2013.04.009

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

Copyright © 2015 Hasmim, Messai, Ziani, Thiery, Bouhris, Noman and Chouaib. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### **Granzyme B–Activated p53 Interacts with Bcl-2 To Promote Cytotoxic Lymphocyte–Mediated Apoptosis**

Thouraya Ben Safta,\*<sup>,†,‡</sup> Linda Ziani,<sup>\*,†,‡</sup> Loetitia Favre,<sup>\*,†,‡</sup> Lucille Lamendour,<sup>\*,†,‡</sup> Gwendoline Gros,<sup>\*,†,‡</sup> Fathia Mami-Chouaib,<sup>\*,†,‡</sup> Denis Martinvalet,<sup>§</sup> Salem Chouaib,<sup>\*,†,‡</sup> and Jerome Thiery<sup>\*,†,‡</sup>

Granzyme B (GzmB) plays a major role in CTLs and NK cell-mediated elimination of virus-infected cells and tumors. Human GzmB preferentially induces target cell apoptosis by cleaving the proapoptotic Bcl-2 family member Bid, which, together with Bax, induces mitochondrial outer membrane permeabilization. We previously showed that GzmB also induces a rapid accumulation of the tumor-suppressor protein p53 within target cells, which seems to be involved in GzmB-induced apoptosis. In this article, we show that GzmB-activated p53 accumulates on target cell mitochondria and interacts with Bcl-2. This interaction prevents Bcl-2 inhibitory effect on both Bax and GzmB-truncated Bid, and promotes GzmB-induced mitochondrial outer membrane permeabilization. Consequently, blocking p53–Bcl-2 interaction decreases GzmB-induced Bax activation, cytochrome *c* release from mitochondria, and subsequent effector caspases activation leading to a decreased sensitivity of target cells to both GzmB and CTL/NK-mediated cell death. Together, our results define p53 as a new important player in the GzmB apoptotic signaling pathway and in CTL/NK-induced apoptosis. *The Journal of Immunology*, 2015, 194: 418–428.

ytotoxic T lymphocytes and NK cells eliminate virusinfected or malignantly transformed cells principally by releasing the contents of cytotoxic granules into the immune synapse formed with their target cell (1). The granule mediators of target cell lysis are serine proteases, known as granzymes (Gzms), which induce programmed cell death (2–4) after they are delivered into the target cell cytoplasm by the pore-forming protein perforin (PFN) (5–7).

Granzyme B (GzmB), one of the main mediators of cell death by the cytotoxic granules pathway, is the most extensively studied Gzm. Human GzmB (hGzmB) preferentially induces target cell apoptosis in a mitochondria-dependent manner, which is a highly regulated process involving the Bcl-2 family proteins. HGzmB cleaves the proapoptotic Bcl-2 family member, BH3-only protein, Bid (8, 9). Truncated Bid (tBid) disrupts the mitochondrial outer

Address correspondence and reprint requests to Dr. Jerome Thiery, U753 INSERM, Gustave Roussy Cancer Campus, 114 Rue Edouard Vaillant, F-94805 Villejuif Cedex, France. E-mail address: jerome.thiery@gustaveroussy.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CAD, caspase-activated DNase; CMA, concanamycin A; Gzm, granzyme; GzmB, Granzyme B; hGzmB, human GzmB; MOM, mitochondrial outer membrane; MOMP, MOM permeabilization; pAb, polyclonal Ab; PFN, perforin; PFT, pifthrin; RT, room temperature; siRNA, small interfering RNA; tBid, truncated Bid; wtp53, wild type p53.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

membrane (MOM) to cause the release of the proapoptotic factors cytochrome *c* and Smac leading to caspase 3 activation and target cell apoptosis (10). Moreover, hGzmB induces cell death in a Bax or Bak-dependent manner (8, 11), while this pathway is blocked by overexpression of important prosurvival Bcl-2 family proteins, including Bcl-2 or Bcl- $X_L$  (12). It has also been suggested that GzmB may induce target cell death in absence of Bid, Bax, and Bak (13), by directly activating caspase 3 (8, 14), cleaving the inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to free CAD (15, 16), and/ or by cleaving several caspases (17) or noncaspase substrates (18, 19).

Our previous studies also suggested the existence of a relationship between the tumor suppressor p53 and hGzmB-induced apoptosis. Indeed, we demonstrated that hGzmB induces a rapid activation of the endonuclease CAD in a Bid- and caspase 3-independent manner that triggers early DNA damages. An ATMrelated genotoxic stress-activated kinase, hSMG-1, is then rapidly activated in response to hGzmB-induced early DNA damage (20) and would be, at least in part, responsible for a rapid wild type p53 (wtp53) stabilization and activation in a melanoma target model after interaction with autologous CTL clones or after hGzmB treatment (21). Furthermore, RNA interference-mediated inhibition of p53 significantly decreased target cell killing induced by CTLs or hGzmB (21). Taken together, these results indicate that wtp53 is involved, by an unknown mechanism, in the modulation of the PFN/hGzmB-dependent apoptotic pathways during the killing of target cells by immune effector cells.

It is well established that wtp53 acts as a stress-activated transcription factor that activates transcription of genes involved in apoptosis induction or regulation (22, 23), although some effects of p53 are independent of transcription (24). In this regard, compelling evidences show that the transcription-independent function of p53 relies on its interaction with several members of the Bcl-2 family (25, 26). Indeed, it has been reported that wtp53 protein can promote the permeabilization of the MOM by forming complexes with the protective Bcl-X<sub>L</sub> or Bcl-2 proteins, hence inhibiting their antiapoptotic effects (27). It was also demonstrated that p53 can accumulate in the cytoplasm, where it directly activates the cytosolic

<sup>\*</sup>U753 INSERM, 94805 Villejuif, France; <sup>†</sup>Gustave Roussy Cancer Campus, 94805 Villejuif, France; <sup>‡</sup>University Paris Sud, Faculty of Medicine, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France; and <sup>§</sup>Department of Cell Physiology and Metabolism, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland

Received for publication August 4, 2014. Accepted for publication October 21, 2014.

This work was supported by INSERM, by the Association pour la Recherche sur le Cancer (2012-2013; Grant SFI20121205624), and by fellowships from the French Ligue Nationale Contre Le Cancer (to L.Z. and J.T.).

T.B.S. and L.Z. performed experiments and analyzed data. L.F. and L.L. also performed and helped analyze some experiments. G.G. provided technical assistance with CTL culture. F.M.-C. provided the H33 CTL clone. D.M. purified human GzmB and participated in helpful discussion. J.T. conceived and supervised the project, designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. S.C. edited the manuscript.

proapoptotic protein Bax (28) or mitochondrial Bak (29) to induce the mitochondrial release of apoptogenic factors.

Thus, the aim of this study was to investigate the mechanisms of p53-dependent regulation of the hGzmB signaling pathway leading to apoptotic cell death. We demonstrate that after PFN/hGzmB treatment, p53 quickly accumulates on target cell mitochondria and interacts with Bcl-2. This p53–Bcl-2 interaction prevents the inhibitory interaction of hGzmB-activated tBid with Bcl-2 and also favors the release of Bax from Bax–Bcl-2 complexes. Consequently, p53–Bcl-2 interaction is of major importance in hGzmB apoptotic signaling pathway as shown by the pharmaco-logical inhibition of this interaction leading to hGzmB cell death signaling blockage at the mitochondria level and to a decrease of both hGzmB- and CTL/NK-induced apoptosis.

#### **Materials and Methods**

#### Cell lines

MCF7/Caspase3 (30), T1, and A549 cells were grown in RPMI 1640/ GlutaMAX supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 1% sodium pyruvate (Life Technologies). The T1 tumor cell line was established from the primary lesion of a patient suffering from a melanoma (31). The LT12 CTL clone was isolated from T1 autologous tumor-infiltrating lymphocytes, recognized a peptide derived from the MelanA/MART-1 Ag, and was maintained in culture as described previously (20, 31). The NK92 cell line and NK cells isolated from helthy donors with human CD56<sup>+</sup> selection kit (Stemcell) were cultured in RPMI 1640/GlutaMAX supplemented with 10% of FCS and 300 U/ml recombinant human IL-2. The H33 CTL clone was maintained in culture as described previously and recognizes the allogeneic MCF7 cell line in an HLA-A2–restricted manner (32).

#### Pifithrin treatment

Target cells were pretreated 15 h with 5–10  $\mu$ M pifithrin (PFT)- $\mu$ , 20  $\mu$ M PFT- $\alpha$  (Sigma-Aldrich), or DMSO before incubation with cytotoxic cells, buffer, sublytic native rat PFN, and/or hGzmB in presence of PFT or DMSO.

#### Treatment with PFN and GzmB

Native rat PFN was purified from RNK16 cells, and native hGzmB was purified from YT-Indy cells as described previously (33). Target cells were diluted in HBSS with 10 mM Hepes pH 7.5, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4% BSA before adding sublytic PFN  $\pm$  100 nM hGzmB, diluted in PFN buffer (HBSS, 10 mM Hepes pH 7.5). The PFN sublytic concentration that delivers Gzms to induce apoptosis without excessive necrosis was determined independently for each experiment by flow cytometry (BD Accuri C6) as described previously (33).

#### Inhibition of GzmB activity

The GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl (a synthetic peptide that irreversibly inhibits GzmB activity; Biovision) (34) was used at 100  $\mu$ M to preincubate effector cells for 2 h before incubation with target cells (concentration of inhibitor during coincubation: 50  $\mu$ M).

#### Western blot

Total cellular extracts were prepared by lysing cells in RIPA buffer (Pierce) containing a mixture of protease inhibitors (Roche) and 2 mM sodium orthovanadate before denaturation by boiling in Laemmli buffer and SDS PAGE separation. Blots were probed with the following Abs: anti-p53 mouse mAb (clone DO-1), anti–Bcl-2 mouse mAb (clone 100), and anti-Bax mouse mAb (clone N20) from Santa Cruz Biotechnology; anti–pho-pho-p53(Ser<sup>37</sup>) rabbit polyclonal Ab (pAb), anti–caspase 3 mAb (clone 3G2), anti-cleaved caspase 3 (p19/p17) rabbit pAb (clone 5A1E), anti–caspase 9 rabbit pAb, anti-PARP rabbit pAb, anti–Bcl-X<sub>L</sub> mouse mAb (clone 54H6), and anti-Bid rabbit pAb from Cell Signaling; anti-tBid (p15) rabbit pAb from Invitrogen; and HRP-conjugated anti-actin mouse mAb from Sigma-Aldrich. Western blot quantification was performed using the ImageJ densitometry software.

#### Formation of E:T cell conjugates

Target cells were incubated with NK92 or H33 effector cells in Ca<sup>2+</sup> free medium during 20 min at 37°C to allow conjugate formation. Synchronized exocytosis of the cytotoxic granules contents was triggered by

adding 4 mM  $CaCl_2$  before analysis by microscopy, flow cytometry, or cell fractionation at the indicated time.

#### Microscopy

Target cells were grown on collagen-coated glass coverslips (Sigma-Aldrich), incubated with Cy5-CytoPainter mitochondrial staining solution (Abcam), and treated with sublytic PFN  $\pm$  100 nM hGzmB, NK92, or H33 effector cells (E:T ratio 3:1). After 30 min, cells were fixed and stained with an anti-p53 mouse mAb (clone DO-1) followed by incubation with a goat Alexa Fluor 488–conjugated secondary Ab (Life Technologies) as described previously (5). Coverslips were then washed three times in PBS and mounted in Vectashield mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories) before imaging (IX83 microscope; Olympus) and analysis (CellSense Dimension software; Olympus).

#### Cytosol-mitochondria-nucleus fractionation

After pretreatment with DMSO or 10  $\mu$ M PFT- $\mu$  and 30 min treatment with PFN  $\pm$  100 nM hGzmB or NK92 cells (E:T ratio 3:1), 5 × 10<sup>6</sup> target cells per condition were fractionated into cytosolic and high-purity mitochondrial fraction using a Qproteome mitochondria isolation kit (Qiagen) or into cytosolic, mitochondrial, and nuclear fractions using a standard cell fractionation kit (Abcam) following manufacturer's protocol. Cytosolic, mitochondrial, and/or nuclear extracts from the same number of cells were denatured in Laemmli buffer before immunoblotting with anti-p53 (clone DO-1) or anti-cytochrome *c* (clone 7H8.2C12; BD Pharmingen) mouse mAbs. Anti-vinculin (clone Vin-11-5; Sigma-Aldrich), anti-mitochondrial Hsp70 (MtHsp70/Grp75; clone JG1; Abcam), and anti-PCNA (clone PC10; Cell Signaling) or anti-topoisomerase II  $\alpha$  (clone Ki-S1; Millipore) mouse mAbs were used to verify the purity of cytosolic and mitochondrial fractions and the absence of nuclear contamination.

#### Bcl-2 immunoprecipitation

After pretreatment with PFT- $\mu$  or DMSO and PFN  $\pm$  hGzmB loading, Bcl-2 immunoprecipitation was performed using a classical immunoprecipitation kit (Pierce) and an anti–Bcl-2 mouse mAb (clone 100) overnight at 4°C. Immune complexes were eluted and washed before boiling in Laemmli buffer. Immunoprecipitates and 1% of the cell lysates (input) were run in 4–20% precast SDS-PAGE gel and immunoblotted with HRP-conjugated anti–Bcl-2 mouse mAb (clone 100), anti-p53 rabbit pAb (clone FL-393; Santa Cruz Biotechnology), HRP-conjugated anti-Bax rabbit pAb (clone N20), or anti-tBid (p15) rabbit pAb (Invitrogen).

#### Bid and p53 small interfering RNA transfection

Silencer select validated Bid, p53, and control small interfering RNAs (siRNAs) were purchased from Life Technologies. Subconfluent cells were transfected with siRNA using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) in Opti-MEM according to the manufacturer's instructions.

#### Apoptosis assays

To assess apoptosis, we analyzed cells incubated for 2 h at 37°C with buffer or sublytic PFN  $\pm$  100 nM hGzmB for caspase activation by flow cytometry using M30-FITC mAb staining according to the manufacturer's protocol (M30 CytoDEATH; Roche) to detect an effector caspase-cleavage product of cytokeratin 18 (35).

#### Mitochondrial outer membrane permeabilization assay

MOM permeabilization (MOMP) was evaluated by 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide DioC6 (3) labeling (Life Technologies). After sublytic PFN  $\pm$  100 nM hGzmB treatment or incubation with NK92 (E:T ratio 5:1), cells were incubated 10–15 min at 37°C with 40 nM DioC6 (3) in prewarmed HBSS. The stained cells were then separated from the staining solution by centrifugation, resuspended in PBS, and immediately analyzed by flow cytometry (BD Accuri C6). For experiments with NK cell treatment, MCF7-Casp3 cells were prestained with 1 nM Vybrant DiD (Life Technologies) to exclude NK cells and to allow analysis of the target cells.

#### Chromium release assay

Cytotoxicity was measured by a 4 h chromium release assay as previously described (21). Inhibition of PFN/Gzm-mediated cytotoxic pathway was performed by using effector cell preincubation for 2 h with 100 nM concanamycin A (CMA; Sigma-Aldrich) (concentration of CMA during lysis: 50 nM) or with the GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl before incubation with target cells. Experiments were performed in triplicate. Data were expressed as the percentage of specific <sup>51</sup>Cr release from target cells, calculated as (experimental release – spontaneous release)/(maximum release – spontaneous release)  $\times$  100.

#### Measurement of Bax activation and detection of p53 intensity by flow cytometry

After 30 min treatment with PFN  $\pm$  100 nM hGzmB, cells were washed with ice-cold PBS and fixed for 5 min in PBS/0.25% PFA at room temperature (RT). Cells were then washed with PBS and incubated 30 min at

RT with an anti-Bax mAb (clone 6A7; Santa Cruz Biotechnology) diluted in PBS/200  $\mu$ g/ml digitonin (Sigma-Aldrich). Cells were then washed with PBS, incubated 30 min at RT with a goat anti-mouse FITC-conjugated secondary Ab (Beckman Coulter) in PBS, and washed twice with PBS before flow cytometry analysis (BD Accuri C6). For the detection of p53 intensity, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) 30 min after PFN/GzmB treatment, then incubated with an anti-p53 mouse mAb (clone DO-1) and an Alexa 488–conjugated



FIGURE 1. GzmB induces p53 accumulation in target cell. (A and B) Within 30 min of treatment with sublytic PFN and hGzmB, p53 accumulates in MCF7-Casp3 target cells. A representative Western blot analysis of three independent experiments is shown in (A). Actin was used as loading control. p53 mean fluorescence intensity (MFI) fold increase analyzed by flow cytometry analysis from three independent experiments is displayed in (B). The p values were determined by unpaired two-tailed Student t test. (C) Within 20 min of treatment with sublytic PFN and hGzmB, p53 is phosphorylated (Ser<sup>37</sup>). An equal amount of total p53 protein was loaded in each well and served as loading control. (D and E) p53, mitochondria, and nucleus staining of MCF7-Casp3 target cells treated for 30 min with PFN  $\pm$  hGzmB (D) or with the NK92 cell line or the H33 CTL clone preincubated or not with an irreversible GzmB inhibitor (E:T ratio 3:1) (E). Scale bars, 10 µM (D), 5 µM (E). Dashed lines represent plasma membrane.

secondary Ab before analysis of the mean fluorescence intensity by flow cytometry (BD Accuri C6).

#### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SD. The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* tests.

#### Results

### hGzmB induces wtp53 accumulation on target cell mitochondria

To study the role of p53 in the regulation of hGzmB apoptotic signaling pathway and in hGzmB-mediated cell death, we used the wtp53 breast carcinoma cell line MCF7. Because MCF7 are deficient for procaspase 3, which is important for hGzmB-induced cell death, we used cells stably expressing physiological level of procaspase 3 (MCF7-Casp3; Supplemental Fig. 1A). p53 can be activated by gamma irradiation in these cells, and hGzmB activates the mitochondrial pathway of apoptosis in this cell line, with Bid cleavage, Bax activation, procaspase 3, and PARP cleavages leading to apoptosis (Supplemental Fig. 1B-F). As previously reported in melanoma cells (20, 21), the treatment of MCF7-Casp3 cells with 100 nM hGzmB in the presence of sublytic concentration of PFN results in a significant wtp53 accumulation within  $\sim 30$  min (Fig. 1A, 1B) and a wtp53 phosphorylation (Ser<sup>37</sup>; one of the key events in DNA damage-induced stabilization and activation) within ~20 min after PFN/GzmB treatment (Fig. 1C). Moreover, fluorescence microscopy analysis of p53 subcellular localization after 30 min target cell loading with PFN/hGzmB or incubation with the NK cell line NK92 or the allogeneic CTL clone H33 showed a mainly mitochondrial p53 accumulation within target cells, which can be abrogated by preincubating effector cells with the irreversible GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl

(Fig. 1D, 1E). Similarly, after a classical cytosol/mitochondria/ nucleus or a high-purity fractionation of mitochondria, p53 accumulates in the MCF7-Casp3 target cell mitochondrial fraction after 30 min treatment with PFN/hGzmB (Fig. 2A-C), but this accumulation can also be detected earlier (Fig. 2D). Of note, similar results were obtained using the Casp3<sup>-</sup> parental MCF7 cell line (data not shown). Moreover, we also detected p53 in the mitochondrial fraction after target cell incubation with the NK92 cell line in the absence of the irreversible GzmB inhibitor (Fig. 2E). Together, these observations demonstrate that hGzmB induces a rapid p53 accumulation in the mitochondrial compartment of treated cells. We also concluded that p53 might control hGzmB-induced cell death through its nontranscriptional activity at the mitochondria level. We thus hypothesized that p53 regulates hGzmB-induced cell death by interacting with Bcl-2 to facilitate tBid-dependent Bax activation, MOMP, apoptogenic factors release, and effector caspases activation.

#### hGzmB-activated p53 interacts with Bcl-2

To demonstrate the possible p53–Bcl-2 interaction in target cells after PFN/GzmB treatment, we used the cell-permeable sulfonamide PFT- $\mu$  that blocks p53 interaction with Bcl-X<sub>L</sub> and Bcl-2 proteins, and selectively inhibits p53 translocation to mitochondria without affecting the transactivation function of p53 (36). We first verified that PFT- $\mu$  did not affect p53 stabilization in response to PFN/hGzmB treatment (Supplemental Fig. 2A, 2B). We then performed a cytosol/mitochondria fractionation of DMSO or 10  $\mu$ M PFT- $\mu$ -pretreated MCF7-Casp3 cells, loaded with PFN  $\pm$ hGzmB. DMSO-pretreated cells showed an accumulation of p53 in the mitochondrial fraction after 30 min treatment with PFN/ hGzmB, which can be blocked by PFT- $\mu$  (Fig. 3A, 3B). Similarly, PFT- $\mu$  pretreatment decreased p53 mitochondrial accumulation in



**FIGURE 2.** GzmB-induced p53 accumulates on target cell mitochondria. (A-C) After classical cytosol/mitochondria/nucleus (A) or high-purity cytosol/ mitochondria (B) fractionation experiments of target cells after 30 min treatment with PFN/hGzmB, p53 is detectable in the mitochondrial fraction of treated cells. Representative immunoblots are shown. Immunoblotting with anti-vinculin, anti-mitochondrial Hsp70, and anti-PCNA or Topoisomerase II mAb was used to verify the purity of cytosolic (C), mitochondrial (M) fraction, and nuclear (N), and the absence of nuclear contamination in mitochondrial extract, respectively. Blot exposure was titrated down to the point where p53 is almost undetectable in control conditions (buffer, PFN alone, and GzmB alone) to show increased mitochondrial accumulation in PFN/GzmB-treated cells. The p53/mtHsp70 ratio from (B) was calculated by densitometry and display in (C) (mean  $\pm$  SD from three independent experiments). The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* test. (**D**) Mitochondrial and cytosolic fractions were isolated as in (B) after 25 to 30 min treatment with hGzmB or PFN/hGzmB treatment. (**E**) MCF7-Casp3 target cell incubation for 30 min with the NK92 cell line (E:T ratio 3:1) also induces p53 mitochondrial translocation, which can be strongly decreased after NK cell preincubation with an irreversible GzmB inhibitor.



FIGURE 3. p53 interacts with Bcl-2 in response to GzmB. (A and B) PFT-µ, a cell-permeable sulfonamide that blocks p53 interaction with Bcl-2, inhibits p53 accumulation on mitochondria of PFN/hGzmB-loaded cells. A representative immunoblot is shown in (A). The p53/mitochondrial Hsp70 ratio was calculated by densitometry and display in (B) (mean  $\pm$  SD from three independent experiments). The p values were determined by unpaired two-tailed Student t test. (C) PFT- $\mu$  also blocks p53 mitochondrial accumulation in target cells after MCF7-Casp3 interaction with NK92 cells (E:T ratio 3:1). NK92 preincubated with an irreversible GzmB inhibitor or MCF7-Casp3 target cells pretreated with PFT-a, which blocks p53 transcriptional activity, were used as controls. Blot exposure (A and C) was titrated down to the point where p53 is almost undetectable in control conditions (buffer or without NK treatment) to show the increased or decreased mitochondrial accumulation in PFN/hGzmB or NK-treated cells. (D) p53 interacts with Bcl-2 after 30 min PFN/hGzmB treatment. Bcl-2 was immunoprecipitated before immunoblotting for Bcl-2, p53, and actin as a negative control. Whole-cell lysate (input) used for the immunoprecipitation was also immunoblotted. The experiment was performed twice. (E) PFTµ pretreatment inhibits p53-Bcl-2 interaction after PFN/hGzmB

target cells after incubation with the NK92 cell line, whereas PFT- $\alpha$ , which mainly blocks p53 transcriptional activity (37), has no effect (Fig. 3C). Furthermore, Bcl-2–p53 complexes were detected by immunoprecipitating Bcl-2 30 min after PFN/hGzmB loading (Fig. 3D). Moreover, Bcl-2–p53 complexes were detected in control cells pretreated with DMSO after PFN/hGzmB loading, but not in PFT- $\mu$  pretreated cells (Fig. 3E). Together, these results indicate that hGzmB-activated p53 interacts with Bcl-2, which constitutively resides at MOM.

### *p53–Bcl-2 interaction regulates GzmB-induced Bax activation and MOMP*

We next investigated whether p53-Bcl-2 interaction plays a role in tBid and Bax-dependent GzmB-induced MOMP. As previously described, MCF7-Casp3 target cell treatment with PFN/GzmB generated a significant amount of tBid (p15), which is mainly localized in the mitochondrial fraction. We also detected a significant amount of Bax in both cytosolic and mitochondrial compartments in PFN or hGzmB alone-treated cells, but Bax became enriched at the mitochondria after PFN/GzmB treatment (Fig. 4A). Moreover, Bid inhibition by siRNAs strongly inhibits PFN/GzmB-induced caspase 3 activation (Fig. 4B, 4C), confirming that Bid is crucial for hGzmB-induced cell death in our model. These results demonstrate that GzmB-induced mitochondrial p53 cannot lead to cell death by itself but more likely regulates tBiddependent Bax activation, a key step in hGzmB-induced MOMP and apoptosis (10). It is known that Bax changes conformation before oligomerization in the MOM. The conformational change of Bax exposes its N terminus and can be specifically detected by an anti-Bax Ab (clone 6A7) that binds to this region (38). Flow cytometry experiments using the 6A7 Bax mAb show an ~50% decrease of Bax activation after PFN/GzmB loading after PFT-µ pretreatment (Fig. 4D, 4E). Moreover, this decrease of Bax activation correlates with a decrease of PFN/hGzmB-induced MOMP after PFT-µ preincubation, as measured by DioC6 (3) staining (Fig. 4F, 4G). Similar results were also obtained after NK92 effector cell incubation with PFT-µ-pretreated or p53 siRNAtransfected target cells (Supplemental Fig. 2C, 2D). Finally, PFN/hGzmB-induced cytochrome c release from the mitochondria to the cytosol is also significantly decreased by a PFT-µ pretreatment (Fig. 4H, 4I). These results suggest that hGzmBinduced p53-Bcl-2 interaction promotes tBid-dependent Bax activation, MOMP, and cytochrome c release.

### GzmB-induced p53–Bcl-2 complexes regulate Bax and tBid interaction with Bcl-2

25

55

40

25

55

We next investigated the mechanisms involved in p53-dependent regulation of Bax activation in response to hGzmB after its interaction with Bcl-2. It has been shown that the mitochondrial pathway is blocked by prosurvival Bcl-2, which binds and blocks the active form of Bid or Bax by different mechanisms, depending of the nature of the apoptotic stimulus (39–41). The "activator" model (or mode 1) postulates that some BH3-only proteins (e.g., tBid) transiently bind to Bax and induce conformational changes required for stable membrane insertion. In this model, Bcl-2 proteins sequester the activator BH3-only proteins and neutralize them (42). In contrast, the "inactivator" model (or mode 2) proposes that the primary function of antiapoptotic protein Bcl-2 is to neutralize the proapoptotic effector proteins Bax by forming heterodimeric complexes (28, 43), limiting their capacity to form

loading. Bcl-2 was immunoprecipitated before immunoblotting for Bcl-2, p53, and actin as in (C). The experiment was performed twice.



**FIGURE 4.** Inhibition of p53–Bcl-2 interaction decreases GzmB-induced Bax activation and MOMP. (**A**) Bax and tBid accumulate in mitochondria of PFN/hGzmB-loaded cells. A representative immunoblot of two independent experiments is shown. (**B** and **C**) Bid is essential for GzmB-induced caspase 3 activation. MCF7-Casp3 target cells were transfected with control (Ctrl) or Bid siRNAs (B) before loading with PFN  $\pm$  hGzmB for 45 min (C). Bid siRNAs inhibit caspase 3 and PARP cleavage. (**D** and **E**) PFT- $\mu$  pretreatment decreases Bax activation after 30 min PFN/hGzmB loading, assessed by flow cytometry using anti-Bax 6A7 mAb. Representative flow cytometry histograms are shown in (D) and mean  $\pm$  SD of three independent experiments in (E). (**F** and **G**) PFT- $\mu$  pretreatment decreases MOMP after 30 min PFN/hGzmB loading, assessed by flow cytometry histograms are shown in (F) and mean  $\pm$  SD of three independent experiments in (G). (**H** and **I**) PFT- $\mu$  pretreatment decreases cytochrome *c* release from the mitochondrial (m) to the cytosolic fraction (c) of PFN/hGzmB-loaded cells. A representative immunoblot is shown in (H). The ratio of cytosolic/mitochondrial cytochrome *c* was calculated by densitometry and display in (I) (mean  $\pm$  SD from three independent experiments). The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* test.

pores in the MOM. Based on these models, the earliest step in the process of hGzmB-induced cell death leading to MOMP that could be modulated by p53-Bcl-2 interaction is binding of tBid or Bax to Bcl-2. To answer this question, we immunoprecipitated Bcl-2 after PFN/hGzmB loading in DMSO- or PFT-µ-pretreated cells before immunoblotting with Bcl-2, p53, Bax, and tBid mAbs (Fig. 5). Bcl-2-p53 complexes were only detected in DMSO-pretreated cells after PFN/hGzmB loading and inhibited by PFT-µ. Bax did coprecipitate with Bcl-2 in control DMSOpretreated cells and was released from Bcl-2 after PFN/hGzmB treatment. Importantly, the inhibition of p53-Bcl-2 interaction by PFT-µ inhibits the release of Bax from Bcl-2 after PFN/ hGzmB treatment. With respect to tBid, we did not detect Bcl-2-tBid interaction in DMSO-pretreated cells after PFN/hGzmB loading. However, Bcl-2-tBid complexes were detected after PFN/GzmB treatment when Bcl-2-p53 interaction was inhibited by PFT-µ. Together, these data suggest that p53–Bcl-2 interaction in response to PFN/hGzmB treatment favors the release of Bax from its inhibitor Bcl-2 and also prevents tBid interaction with Bcl-2.

#### p53–Bcl-2 regulation of GzmB-induced MOMP promotes subsequent effector caspase activation

To further demonstrate that p53-Bcl-2 interaction regulates hGzmB apoptotic signaling pathway at the mitochondrial level, we then performed immunoblotting analysis of key proteins involved in this pathway upstream and downstream of mitochondria. Bid (p22) cleavage into tBid (p15) and cleavage of procaspases 9 and 3 were thus detected 15-30 min after PFN/hGzmB loading of DMSO-pretreated target cells, as expected. In contrast, PFT-µ pretreatment did not interfere with hGzmB-mediated Bid cleavage but inhibits the cleavage of procaspases 9 and 3 (Fig. 6A). Nevertheless, a first cleavage of procaspase 3 (p19) is still observed in PFT-µ-pretreated cells after 20 min treatment with PFN/hGzmB, which might reflect a direct but incomplete cleavage of procaspase 3 by hGzmB. In this regard, it has been proposed that GzmB can initiate effector caspases activation but cannot fully process procaspase 3 without disruption of the mitochondrial membrane and the release of second mitochondrial activator of caspases/Diablo and HtrA2/Omi that facilitate caspase 3 full activation by blocking the inhibitory action of inhibitor of apoptosis proteins (10). Sim-



FIGURE 5. p53–Bcl-2 interaction favors the release of Bax from Bcl-2 and prevents tBid interaction with Bcl-2 in response to GzmB. p53–Bcl-2 interaction in response to hGzmB promotes the release of Bax from Bcl-2 and inhibits tBid interaction with Bcl-2. DMSO or 10  $\mu$ M PFT- $\mu$ –pretreated MCF7-Casp3 cells were loaded with hGzmB alone (negative control) or PFN/GzmB for 30 min before Bcl-2 immunoprecipitation and immunoblotting with anti–Bcl-2, anti-p53, and anti-Bax and anti-tBid (p15) mAb. Representative immunoblots from two independent experiments are shown. p53/Bcl2, Bax/Bcl2, and tBid/Bcl2 ratios were calculated by densitometry. A.U., arbitrary unit.

ilarly, the reduction of p53 expression by siRNAs strongly decreased PFN/hGzmB-induced procaspases 9 and 3 activation but did not interfere with Bid cleavage (Fig. 6B, 6C). Finally, neither DMSO nor PFT- $\mu$  pretreatment interfered with Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>

or Bax expression (Fig. 6D). Overall, these data demonstrate that inhibiting p53–Bcl-2 interaction after PFN/GzmB treatment blocks MOMP, leading to the inhibition of effector caspases activation.

### Blocking p53–Bcl-2 interaction inhibits GzmB-induced apoptosis

Our results suggest that blocking p53-Bcl-2 interaction after PFN/ hGzmB treatment inhibits hGzmB-induced MOMP and hGzmB apoptotic signaling pathway downstream of mitochondria, leading to a resistance to GzmB-induced cell death. To confirm this finding, we compared PFN/hGzmB-induced apoptosis by measuring effector caspases activation in either DMSO or 5-10 µM PFT-µ-pretreated cells. For effector caspase activation, we used a flow cytometry-based assay using the M30-FITC mAb to detect a caspase 3 cleavage product of cytokeratin 18 (35). Pretreatment of MCF7-Casp3 cells with 7.5 or 10 µM PFT-µ before PFN/ hGzmB loading results in a significant dose-dependent inhibition of hGzmB-mediated apoptosis (Fig. 7A, 7B). Similar results were also obtained in MCF7-Casp3 cells transfected with p53 siRNA (Fig. 7C) or using the wtp53 melanoma and lung carcinoma cell lines T1 and A549 pretreated with PFT-µ (Fig. 7D). Moreover, the pretreatment of target cells with PFT-a, which mainly blocks p53 transcriptional activity (37), only slightly decreases PFN/hGzmBinduced apoptosis compared with PFT-µ (Fig. 7E), suggesting that p53 function on hGzmB-induced cell death is mainly mediated by its nontranscriptional activity. Together, these data demonstrate that hGzmB-induced wtp53 accumulation to mitochondria and

FIGURE 6. Inhibition of p53-Bcl-2 interaction blocks GzmB signaling pathway downstream of mitochondria. (A) Analysis of hGzmB signaling pathway in MCF7-Casp3 cells pretreated with DMSO or 10  $\mu M$  PFT- $\mu$  and loaded with PFN  $\pm$ hGzmB for 20-45 min. Bid (p22), tbid (p15), procaspase 9 (p47), procaspase-3 (p35), and cleaved caspases-3 (p19/p17) were analyzed by immunoblot. PFT-µ does not interfere with GzmB-mediated Bid cleavage but inhibits the cleavage of procaspases 9 and 3. (B and C) p53 knockdown decreases GzmBinduced caspase 9 and 3 activation but does not affect Bid cleavage. MCF7-Casp3 target cells were transfected with control (Ctrl) or p53 siRNAs (B) before loading with PFN  $\pm$  hGzmB for 45 min (C). The p53/actin ratio from (B) was calculated by densitometry and normalized to "1" in untreated (mock) cells. (**D**) PFT- $\mu$  pretreatment does not interfere with Bcl-2, Bcl-X<sub>I</sub>, or Bax expression. Actin was a loading control. Data (A-D) are representative of three independent experiments.





**FIGURE 7.** Inhibition of p53–Bcl-2 interaction alters GzmB–induced apoptosis. (**A** and **B**) PFT-μ decreases PFN/GzmB-induced apoptosis in a dosedependent manner. MCF7-Casp3 cells were pretreated with 5–10 μM PFTμ before PFN  $\pm$  hGzmB loading. Apoptosis was measured by flow cytometry using M30 mAb staining (which recognizes a cytokeratin 18 epitope, revealed after effector caspase cleavage). Representative flow cytometry histograms (A) and mean  $\pm$  SD of percentage M30<sup>+</sup> cells from four independent experiments (B) are shown. (**C**) MCF7-Casp3 transfection with control (ctrl) or p53 siRNAs (leading to ~65% p53 inhibition compared with p53 basal level, measured by Western blot) also decreases PFN/GzmB-induced apoptosis. (**D**) PFT-μ (10 μM) also decreases PFN/hGzmB-induced apoptosis of wtp53 T1 melanoma and A549 lung carcinoma cell lines. (**E**) PFT-μ is more efficient than PFT-α to decrease PFN/hGzmB-induced apoptosis. MCF7-Casp3 cells were pretreated with 10 μM PFT-μ and/or 20 μM PFT-α before PFN/hGzmB loading. Apoptosis in (C)–(E) was measured as in (A) and shown as means  $\pm$  SD of percentage M30<sup>+</sup> cells from three independent experiments. The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* test.

interaction with Bcl-2 is an important modulator of hGzmB-induced apoptosis.

### p53–Bcl-2 interaction is an important modulator of CTL/NK-mediated cell death through the PFN/GzmB pathway

To confirm the physiological relevance of the GzmB-induced p53-Bcl-2 interaction, we then tested whether blocking hGzmBinduced p53-Bcl-2 interaction with PFT-µ can interfere with CTL and NK cell-mediated killing of wtp53 target cells. The lysis of MCF7-Casp3 target cells by the allogeneic H33 CTL clone and by the NK92 cell line was thus strongly decreased by PFT-µ pretreatment (Fig. 8A, 8B) in a dose-dependent manner (Supplemental Fig. 3A). Similarly, the lysis of wtp53 T1 target cells by the autologous LT12 CTL clone and by the NK92 cell line was strongly decreased after PFT-µ pretreatment (Fig. 8C, 8D). Similar results were also obtained after p53 inhibition using siRNA or with NK cells obtained from two healthy donors (Supplemental Fig. 3B-F). Moreover, the inhibition of exocytosismediated pathway by CMA resulted in the abrogation of H33, LT12, NK92, and NK cells isolated from healthy donors' cytotoxicity, indicating that their observed killing is mostly mediated by the PFN/Gzms pathway (Fig. 8A–D and Supplemental Fig. 3B–E) and particularly by GzmB, as confirmed using the GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl (34) (Supplemental Fig. 4). Together, these data demonstrate that hGzmB-induced p53 accumulation to mitochondria and interaction with Bcl-2 is an important regulator of the CTL/NK-mediated killing of wtp53 target cells (Fig. 9).

#### Discussion

Based on our previous results showing that p53 is involved in PFN/ GzmB-dependent cell death during the killing of target cells by immune effector cells, this study was intended to provide insight into the functional relationship between hGzmB and p53 during CTL and NK-mediated killing. In this study, we demonstrated that the death signal induced by hGzmB and mitochondrial pathway are interconnected through p53 and tBid during the CTL/NK-induced killing of target cells. We showed that hGzmB-activated p53 translocates to target cell mitochondria. Because PFT- $\mu$ , which targets only the mitochondrial branch of the p53 pathway without affecting the important transcriptional functions of p53, decreases both hGzmB- and CTL/NK-mediated cell death, we concluded that p53 nontranscriptional activity is an important determinant in

425

FIGURE 8. Inhibition of p53-Bcl-2 interaction decreases CTL/NK-mediated cell death. PFT-µ-pretreated cells are less susceptible to the CTL/NK-mediated cell death. MCF7-Casp3 lysis by the H33 CTL clone (A) or by the NK92 cell line (B) and T1 lysis by the autologous CTL clone LT12 (C) or by the NK92 cell line (**D**) after preincubation with 10  $\mu$ M PFT- $\mu$ or DMSO and cocultured at different E:T ratios are shown (mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments). CMA, which inhibits calcium-dependent exocytosis of cytotoxic granules, was used as an inhibitor of PFN/Gzmdependent lysis (positive control). The p values were determined by unpaired two-tailed Student t test.



the hGzmB apoptotic signaling pathway. Of note, PFT- $\alpha$  also has, to some extent, an effect on hGzmB-induced cell death, even if PFT- $\mu$  inhibition is much more potent. PFT- $\alpha$  was shown to block p53 transcriptional activity by disrupting the nuclear transport of p53 leading to inhibition of p53-dependent transactivation of its target genes (37). Thus, we cannot exclude that p53-controlled transactivation might be, at least in part, an important feature for hGzmB-mediated apoptosis. However, recent evidence demonstrated that PFT- $\alpha$  can also block the apoptosome-mediated processing and activation of caspases 9 and 3, independently of p53 (44). Moreover, cDNA microarrays analysis of p53 direct target genes expression (including Bax, Bcl-2, Bid, Puma, Noxa) after PFN/hGzmB treatment did not emphasize significant upregulation or downregulation (data not shown and Ref. 20), suggesting that p53 transcriptional activity is not essential for the control of hGzmB-induced cell death.

As shown in this article and by others (8, 9), tBid is crucial for hGzmB-induced Bax activation, MOMP, effector caspases cleavage, and apoptosis induction, but Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> were shown to prevent Bax activation and MOMP in response to different stress via the sequestration of tBid (mode 1) (40, 41). Similarly, we found that p53 participates to hGzmB-induced apoptosis by interacting with the antiapoptotic protein Bcl-2. This interaction prevents hGzmB-generated tBid to interact with Bcl-2 as shown by the Bcl-2-tBid complexes observed in PFN/hGzmB-treated cells after PFT-µ preincubation. Consequently, we suggested that p53 indirectly allows tBid-mediated Bax activation, probably by preventing Bcl-2-tBid inhibitory interaction. Accordingly, we observed that blocking p53-Bcl-2 interaction with PFT-µ strongly decreases Bax activation and MOMP. Of note, we confirmed that PFN/hGzmB-activated tBid mainly localized to mitochondria, and that PFN/hGzmB treatment increased mitochondrial Bax level. These results suggest that hGzmB-activated tBid interacts and activates Bax at the mitochondrial membrane. In this scenario, by blocking Bcl-2–tBid interaction, p53 might also favor tBidmediated Bax translocation to mitochondria, where it can be activated. In this regard, a critical role of tBid in the regulation of MOMP has been demonstrated (45). In this model, Bax and tBid seem to only interact when a membrane is present: tBid rapidly binds to mitochondrial membranes and its BH3 domain facilitates the insertion of cytosolic Bax into the membrane, leading to its activation/oligomerization, and subsequently to membrane permeabilization (45).

We also observed a perhaps surprising significant amount of Bax in mitochondrial fraction of untreated cells interacting with Bcl-2. However, recent studies indicated that Bax localizes to both the



FIGURE 9. Proposed model for the role of p53 in GzmB–induced apoptotic signaling pathway. hGzmB-induced p53 accumulates on target cell mitochondria where it interacts with the prosurvival protein Bcl-2. This interaction allows the release of the proapoptotic protein Bax from its inhibitory interaction with Bcl-2 and prevents hGzmB-activated tBid sequestration by Bcl-2. In this case, free tBid activates free Bax to induce MOMP, cytochrome *c* release, and apoptosis. Blocking p53–Bcl-2 interaction with PFT- $\mu$  inhibits Bax release from Bcl-2, favors tBid–Bcl-2 binding, and consequently inhibits MOMP.

cytosol and to mitochondria in healthy cells, and that transient Bax-Bcl-X<sub>L</sub> or Bax-Bcl-2 interaction stimulates retrotranslocation of Bax from the mitochondria into the cytoplasm, thereby sustaining Bax in its cytosolic inactive form (46, 47). In stressed cells, transient interaction with direct activators induces extensive conformational changes of Bax, resulting in the formation of more stable, membrane-embedded Bax. As such, antiapoptotic Bcl-2 proteins were shown to prevent Bax activation and MOMP not only via the sequestration of tBid (mode 1), but also by binding Bax (mode 2), thereby preventing Bax activation (40, 41). In particular, Bcl-X<sub>L</sub> was shown to tie up both tBid and Bax in nonproductive interactions inhibiting Bax binding to membranes (48). Interestingly, we observed that GzmB-activated p53 interaction with Bcl-2 not only prevents tBid interaction with Bcl-2, but also releases Bax from Bax-Bcl-2 complexes. Moreover, in the absence of p53 binding to Bcl-2 after PFT-µ pretreatment, a ternary complex including Bcl-2, Bax, and tBid is observed in response to PFN/hGzmB treatment, but Bax is not activated. These results suggest that tBid binding to Bcl-2 is not enough to free and to activate Bax, and that p53 is important to break this ternary complex. Consistently, recent studies have identified the region of interaction between Bcl-2-Bcl-X<sub>I</sub> proteins and p53 to its DNA-binding domain (49-51). Moreover, it has been demonstrated that Bcl-X<sub>L</sub> conformational change upon binding to wtp53 might facilitate the dissociation of Bcl-X<sub>L</sub>-Bax complexes (49, 52). Thus, we can envision that p53-Bcl-2 interaction in response to PFN/hGzmB treatment also blocks "mode 2" inhibition and favors Bax activation by hGzmB-activated tBid. In particular, p53 might release mitochondrial nonactivated Bax from Bcl-2 interaction, promoting its activation by tBid, but might also facilitate the dissociation of Bcl-2-activated Bax complex, promoting both Bax activation and oligomerization. In this scenario, hGzmBstabilized p53 would operate as a BH3-only protein of the derepressor type freeing proapoptotic tBid and Bax from Bcl-2mediated inhibition (Fig. 9). Similarly, ABT-737, a small molecule that acts as a selective inhibitor of Bcl-2, was shown to increase the levels of both tBid and Bax at the MOM that are free to interact, thereby promoting Bax activation (53), and to block hGzmB-activated tBid inhibition by Bcl-2 in Bcl-2-overexpressing cells (54).

In conclusion, this study emphasizes that the coordinated action of hGzmB-activated p53 and GzmB-cleaved Bid is important for GzmB-induced cell death and for CTL/NK-mediated killing of target cells. Nevertheless, it has been demonstrated that wtp53, but not tumor-derived p53 mutants, binds to Bcl-2 via this DNAbinding domain and can trigger MOMP (52). Because our results point out the importance of Bcl-2/wtp53 interaction in hGzmB-induced apoptosis, further studies will be required to determine whether such p53 mutants can be associated with tumor cell resistance to PFN/hGzmB- and CTL/NK-mediated cell death.

#### Acknowledgments

We thank J.L. Perfettini for helpful discussion and A.C. Jonckheere for technical assistance.

#### Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

#### References

- Lieberman, J. 2003. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 361–370.
- Chowdhury, D., and J. Lieberman. 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. Annu. Rev. Immunol. 26: 389–420.

- Anthony, D. A., D. M. Andrews, S. V. Watt, J. A. Trapani, and M. J. Smyth. 2010. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol. Rev.* 235: 73–92.
- Ewen, C. L., K. P. Kane, and R. C. Bleackley. 2012. A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ*. 19: 28–35.
- Thiery, J., D. Keefe, S. Boulant, E. Boucrot, M. Walch, D. Martinvalet, I. S. Goping, R. C. Bleackley, T. Kirchhausen, and J. Lieberman. 2011. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat. Immunol.* 12: 770–777.
- Thiery, J., D. Keefe, S. Saffarian, D. Martinvalet, M. Walch, E. Boucrot, T. Kirchhausen, and J. Lieberman. 2010. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* 115: 1582– 1593.
- Thiery, J., and J. Lieberman. 2014. Perform: a key pore-forming protein for immune control of viruses and cancer. *Subcell. Biochem.* 80: 197–220.
- Heibein, J. A., I. S. Goping, M. Barry, M. J. Pinkoski, G. C. Shore, D. R. Green, and R. C. Bleackley. 2000. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J. Exp. Med.* 192: 1391– 1402.
- Sutton, V. R., J. E. Davis, M. Cancilla, R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, K. Sedelies, K. A. Browne, and J. A. Trapani. 2000. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. J. Exp. Med. 192: 1403–1414.
- Sutton, V. R., M. E. Wowk, M. Cancilla, and J. A. Trapani. 2003. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* 18: 319–329.
- Wang, G. Q., E. Wieckowski, L. A. Goldstein, B. R. Gastman, A. Rabinovitz, A. Gambotto, S. Li, B. Fang, X. M. Yin, and H. Rabinowich. 2001. Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J. Exp. Med.* 194: 1325–1337.
- Pinkoski, M. J., N. J. Waterhouse, J. A. Heibein, B. B. Wolf, T. Kuwana, J. C. Goldstein, D. D. Newmeyer, R. C. Bleackley, and D. R. Green. 2001. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2inhibitable mitochondrial pathway. J. Biol. Chem. 276: 12060–12067.
- Thomas, D. A., L. Scorrano, G. V. Putcha, S. J. Korsmeyer, and T. J. Ley. 2001. Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14985–14990.
- Darmon, A. J., D. W. Nicholson, and R. C. Bleackley. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377: 446–448.
- Sharif-Askari, E., A. Alam, E. Rhéaume, P. J. Beresford, C. Scotto, K. Sharma, D. Lee, W. E. DeWolf, M. E. Nuttall, J. Lieberman, and R. P. Sékaly. 2001. Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J.* 20: 3101–3113.
- Thomas, D. A., C. Du, M. Xu, X. Wang, and T. J. Ley. 2000. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 12: 621–632.
- Andrade, F., S. Roy, D. Nicholson, N. Thornberry, A. Rosen, and L. Casciola-Rosen. 1998. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 8: 451– 460.
- Zhang, D., P. J. Beresford, A. H. Greenberg, and J. Lieberman. 2001. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granulemediated cytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5746–5751.
- Goping, I. S., T. Sawchuk, D. A. Underhill, and R. C. Bleackley. 2006. Identification of alpha-tubulin as a granzyme B substrate during CTL-mediated apoptosis. J. Cell Sci. 119: 858–865.
- Meslin, F., A. Hamaï, B. Mlecnik, F. Rosselli, C. Richon, A. Jalil, G. Wemhoff, J. Thiery, J. Galon, and S. Chouaib. 2011. hSMG-1 is a granzyme B-associated stress-responsive protein kinase. J. Mol. Med. 89: 411–421.
- Meslin, F., J. Thiery, C. Richon, A. Jalil, and S. Chouaib. 2007. Granzyme B-induced cell death involves induction of p53 tumor suppressor gene and its activation in tumor target cells. *J. Biol. Chem.* 282: 32991–32999.
- el-Deiry, W. S., S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* 1: 45–49.
- Junttila, M. R., and G. I. Evan. 2009. p53—a Jack of all trades but master of none. Nat. Rev. Cancer 9: 821–829.
- Moll, U. M., S. Wolff, D. Speidel, and W. Deppert. 2005. Transcriptionindependent pro-apoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 631– 636.
- Galluzzi, L., E. Morselli, O. Kepp, I. Vitale, M. Pinti, and G. Kroemer. 2011. Mitochondrial liaisons of p53. *Antioxid. Redox Signal.* 15: 1691–1714.
- Speidel, D. 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* 20: 14–24.
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, and U. M. Moll. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 11: 577–590.
- Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler, and D. R. Green. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 303: 1010– 1014.
- Leu, J. I., P. Dumont, M. Hafey, M. E. Murphy, and D. L. George. 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* 6: 443–450.

- Yang, X. H., T. L. Sladek, X. Liu, B. R. Butler, C. J. Froelich, and A. D. Thor. 2001. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* 61: 348–354.
- Dufour, E., G. Carcelain, C. Gaudin, C. Flament, M. F. Avril, and F. Faure. 1997. Diversity of the cytotoxic melanoma-specific immune response: some CTL clones recognize autologous fresh tumor cells and not tumor cell lines. *J. Immunol.* 158: 3787–3795.
- 32. Dorothée, G., H. Echchakir, B. Le Maux Chansac, I. Vergnon, F. El Hage, A. Moretta, A. Bensussan, S. Chouaib, and F. Mami-Chouaib. 2003. Functional and molecular characterization of a KIR3DL2/p140 expressing tumor-specific cytotoxic T lymphocyte clone infiltrating a human lung carcinoma. *Oncogene* 22: 7192–7198.
- Thiery, J., M. Walch, D. K. Jensen, D. Martinvalet, and J. Lieberman. 2010. Isolation of cytotoxic T cell and NK granules and purification of their effector proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3: Unit 3.37.
- Kam, C. M., D. Hudig, and J. C. Powers. 2000. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1477: 307–323.
- Leers, M. P., W. Kölgen, V. Björklund, T. Bergman, G. Tribbick, B. Persson, P. Björklund, F. C. Ramaekers, B. Björklund, M. Nap, et al. 1999. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. J. Pathol. 187: 567–572.
- Strom, E., S. Sathe, P. G. Komarov, O. B. Chernova, I. Pavlovska, I. Shyshynova, D. A. Bosykh, L. G. Burdelya, R. M. Macklis, R. Skaliter, et al. 2006. Smallmolecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat. Chem. Biol.* 2: 474–479.
- Gudkov, A. V., and E. A. Komarova. 2005. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 726–736.
- Hsu, Y. T., and R. J. Youle. 1997. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. J. Biol. Chem. 272: 13829–13834.
- Llambi, F., T. Moldoveanu, S. W. Tait, L. Bouchier-Hayes, J. Temirov, L. L. McCormick, C. P. Dillon, and D. R. Green. 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* 44: 517–531.
- Volkmann, N., F. M. Marassi, D. D. Newmeyer, and D. Hanein. 2014. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ.* 21: 206–215.
- Westphal, D., R. M. Kluck, and G. Dewson. 2014. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ*. 21: 196–205.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten, and S. J. Korsmeyer. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only mole-

cules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 8: 705-711.

- Willis, S. N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J. I. Fletcher, J. M. Adams, and D. C. Huang. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19: 1294–1305.
- 44. Sohn, D., V. Graupner, D. Neise, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, and R. U. Jänicke. 2009. Pifithrin-alpha protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell Death Differ.* 16: 869–878.
- Lovell, J. F., L. P. Billen, S. Bindner, A. Shamas-Din, C. Fradin, B. Leber, and D. W. Andrews. 2008. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135: 1074–1084.
- Edlich, F., S. Banerjee, M. Suzuki, M. M. Cleland, D. Arnoult, C. Wang, A. Neutzner, N. Tjandra, and R. J. Youle. 2011. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145: 104–116.
- Schellenberg, B., P. Wang, J. A. Keeble, R. Rodriguez-Enriquez, S. Walker, T. W. Owens, F. Foster, J. Tanianis-Hughes, K. Brennan, C. H. Streuli, and A. P. Gilmore. 2013. Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol. Cell* 49: 959–971.
- Billen, L. P., C. L. Kokoski, J. F. Lovell, B. Leber, and D. W. Andrews. 2008. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* 6: e147.
- Hagn, F., C. Klein, O. Demmer, N. Marchenko, A. Vaseva, U. M. Moll, and H. Kessler. 2010. BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. J. Biol. Chem. 285: 3439–3450.
- Sot, B., S. M. Freund, and A. R. Fersht. 2007. Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. J. Biol. Chem. 282: 29193–29200.
- Petros, A. M., A. Gunasekera, N. Xu, E. T. Olejniczak, and S. W. Fesik. 2004. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR. *FEBS Lett.* 559: 171–174.
- Tomita, Y., N. Marchenko, S. Erster, A. Nemajerova, A. Dehner, C. Klein, H. Pan, H. Kessler, P. Pancoska, and U. M. Moll. 2006. WT p53, but not tumorderived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. J. Biol. Chem. 281: 8600–8606.
- Cristofanon, S., and S. Fulda. 2012. ABT-737 promotes tBid mitochondrial accumulation to enhance TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells. *Cell Death Dis.* 3: e432.
- 54. Sutton, V. R., K. Sedelies, G. Dewson, M. E. Christensen, P. I. Bird, R. W. Johnstone, R. M. Kluck, J. A. Trapani, and N. J. Waterhouse. 2012. Granzyme B triggers a prolonged pressure to die in Bcl-2 overexpressing cells, defining a window of opportunity for effective treatment with ABT-737. *Cell Death Dis.* 3: e344.


Figure S1. Granzyme B induces apoptosis of MCF7-Casp3 cells through the mitochondrial pathway.

(A) MCF7 cells transfected with pro-caspase 3 (MCF7-Casp3) display similar amount of pro-caspase3 than A549, DMS53, IGR-Heu, T1, M4T, Jurkat cells, while MCF7 cells are pro-caspase 3 deficient. (B) P53 accumulation in MCF7-Casp3 cells 5 hr after  $\gamma$ -irradiation (5Gy). (C) PFN/GzmB loading (15-45 min) of MCF7-Casp3 results in Bid and pro-caspase 3 cleavages. (D) Bax is activated after 30 min PFN/GzmB loading, assessed by flow cytometry using anti-Bax 6A7 mAb. A representative flow cytometry histogram is shown. (E-F) PFN/GzmB loading results in MCF7-Casp3 apoptosis, as revealed by flow cytometry analysis using M30 mAb staining (which recognizes a cytokeratin-18 epitope, revealed after effector caspase cleavage) (E) or by western-blot analysis of PARP cleavage (F). Representative flow cytometry histogram (E) and immunoblot (F) of a least three independent experiments are shown.



Figure S2. PFT- $\mu$  does not affect p53 stabilization in response to PFN/GzmB treatment but decreases target cells MOMP in response to NK cells

(A) Within 30 min of treatment with sublytic PFN and human GzmB, p53 accumulates in both DMSO and PFTµ-pre-treated MCF7-Casp3 target cells. Actin was used as loading control. (B) P53 is phosphorylated (Ser37) after treatment with sublytic PFN and human GzmB in both DMSO and PFT-µ-pre-treated MCF7-Casp3 cells. An equal amount of total p53 protein was loaded in each well and served as loading control. Representative western blot analyses of two independent experiments are shown. The p53/actin and P-p53/p53 ratios were calculated by densitometry and normalized to "1" in buffer-treated cells. (C-D) PFT-µ-pre-treatment and p53 siRNA transfection of Vybrant DiD-labelled MCF7-Casp3 cells decrease MOMP after 30 min incubation with the NK92 (Effector:Target ratio 5:1), assessed by flow cytometry using DioC6(3) staining and gating on Vybrant DiD+ cells . Means ± s.d. of three independent experiments are shown. P values were determined by unpaired two-tailed student's t-test.



Figure S3. PFT-µ decreases CTL-mediated killing in a dose dependent manner and alters NK celldependent cell death

(A) MCF7-Casp3 lysis by the H33 CTL clone after pre-incubation with 10 or 7.5 μM PFT-μ or DMSO and cocultured at different effector:target ratios is shown. (B) MCF7-Casp3 lysis by the NK92 clone after transfection with control (ctrl) or p53 siRNAs (leading to ~65% p53 inhibition compared to p53 basal level, measured by western blot) (C-E) PFT-μ-pre-treated cells are less susceptible to NK-mediated cell death, isolated from two healthy donors (NKd). MCF7-Casp3 lysis by NKd1 (A) or NKd2 cell line (C) and T1 lysis by NKd1 (D) or by NKd2 (E) after pre-incubation with 10 mM PFT-μ or DMSO and cocultured at different effector:target ratios are shown. CMA, which inhibits calcium-dependent exocytosis of cytotoxic granules, was used as an inhibitor of PFN/Gzm-dependent lysis (positive control). All data are representative of two independent experiments performed in triplicate.



Figure S4. H33, LT12 CTL clones, NK92 and NKd-mediated cytotoxicity is mainly mediated by the PFN/GzmB pathway.

MCF7-Casp3 lysis by the H33 CTL clone (A), by NK92 (C) or by NK isolated from two healthy donors (D,E) and T1 lysis by the autologous CTL clone LT12 (B) by NK92 (C) or by NK isolated from two healthy donors (D,E) after cytotoxic effector cells pretreatment with the GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl is strongly decreased. Cytotoxicity experiments were performed at the effector:target ratio of 30:1. Means  $\pm$  s.d. of three independent experiments are shown. *P* values were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test.

# Mechanisms of Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis and Relationship with the Tumor Suppressor p53

Jerome Thiery,\* Thouraya Ben Safta, Linda Ziani, & Salem Chouaib

INSERM, U1186, Villejuif, France; Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France; and University Paris-Saclay, Faculty of Medicine, Le Kremlin Bicêtre, France

\*Address all correspondence to: Dr. Jerome Thiery, U1186 INSERM, Gustave Roussy Cancer Campus, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, FRANCE. Tel. +33 1 421 146 50; Fax: +33 1 421 152 88, E-mail: jerome.thiery@gustaveroussy.fr

**ABSTRACT:** Cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells are key effector cells in the immune response against intracellular infection and transformed cells. These killer cells induce multiple programs of cell death to achieve their function of eliminating their targets. In this review, we summarize our current understanding of the signaling pathways involved in target cells apoptosis triggered by the cytotoxic effector cells. We also discuss the role of an important player in the field of apoptosis, the well-known p53 tumor suppressor, in the modulation of cytotoxic lymphocyte-mediated cell death.

KEY WORDS: Cytotoxic lymphocytes, granzymes, death domain receptors, p53, apoptosis

ABBREVIATIONS: CTL: cytotoxic T lymphocytes, NK: natural killer cell, PFN: perforin, Gzms: granzymes, hGzmB: human granzyme B, DR: death receptors, DD: death domain, DED: death effector domain, TNF-R: tumor necrosis factor (TNF) receptor, TRAIL: tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, FADD: Fas-associated protein with death domain, DISC: death inducing signaling complex, cFLIP: cellular FLICE-like inhibitory protein, MOMP: mitochondria outer membrane permeabilization, OMM: Outer mitochondrial membrane, ROS: Reactive oxygen species

## I. INTRODUCTION

Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and natural killer cells (NKs) eliminate their target cells through two major pathways. The first is a secretory pathway involving the exocytosis by effector cells of preformed cytotoxic granules content (also known as the perforin/granzymes pathway).<sup>1</sup> The second is an alternate pathway based on killer cell surface expression of death inducing ligands and on their corresponding death receptors on target cells (also known as the death domain receptors pathway).<sup>2</sup> As such, these pathways are involved in both immune surveillance and immune regulation. However, on the basis of findings in genetically manipulated mice, human genetic diseases, and in vitro studies, the granule exocytosis pathway seems to have the dominant role in eliminating virus-infected cells and in tumor immunosurveillance.<sup>3, 4</sup> In contrast, engagement of the death receptors pathway is critical for maintaining lymphocyte homeostasis in nonpathogenic situations but also forms a pathway of NK and CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated killing of tumor cells.<sup>5</sup>

Target cells destroyed by the perforin/granzymes and the death receptor pathways die a highly regulated death (also known as programmed cell death or apoptosis).<sup>2</sup> During the last decade, numerous groundbreaking studies have been published and describe the signaling cascades triggered by these pathways and by cytotoxic lymphocytes to ultimately induce target cells apoptosis. However, although the key inducers and regulators involved in this process are now well known, major controversies still exist<sup>6, 7</sup> and new players continued to emerge in the field. In this review, we summarize our current understanding of how killer cells destroy their targets through the perforin/granzymes and the death receptor pathways. We also describe several lines of evidence demonstrating the implication of the tumor suppressor p53, a well-known protein involved in stress-induced cell death, in the modulation and induction of CTL and NK cell-mediated apoptosis

<sup>1040-8401/15/\$35.00 © 2015</sup> by Begell House, Inc.

of target cells through the perforin/granzymes and death-domain receptor pathways.

## II. PATHWAYS INVOLVED IN CYTOTOXIC LYMPHOCYTES-INDUCED APOPTOSIS

#### A. The Perforin/Granzyme Pathway

Killer lymphocytes induce apoptosis by releasing cytotoxic mediators from specialized secretory lysosomes, called cytotoxic granules, into the immunological synapse formed with their target cells.<sup>8,9</sup> Cytotoxic granules are complex secretory lysosomes that contain both normal resident lysosomal proteins (i.e., CD107/Lamp1) and effector molecules responsible for target cell elimination.<sup>9</sup> These include perforin (PFN)<sup>10</sup> and a family of highly specific serine proteases known as granzymes (Gzms),<sup>11</sup> which are complexed with a chondroitin sulphate-rich proteoglycan termed serglycin.<sup>12</sup>

PFN is a pore-forming protein that is expressed only by killer lymphocytes and is involved in the delivery of the death-inducing Gzms into the target cell cytoplasm.<sup>10,13–15</sup> In humans, five Gzms have been identified (GzmA, B, H, K and M); GzmA and GzmB have been studied most extensively.<sup>16</sup> Once in target cells, the Gzms independently activate several parallel pathways of programmed cell death by cleaving specific target proteins in the cytoplasm and concentrate within mitochondria and nuclei, where many key Gzms protein substrates reside.<sup>17</sup>

GzmB, one of the main mediators of cell death by the cytotoxic granules pathway, is the most extensively studied Gzm (Fig. 1).<sup>11</sup> Human GzmB (hGzmB) preferentially induces target cells apoptosis in a mitochondria-dependent manner, which is a highly regulated process involving the Bcl-2 family proteins. HGzmB cleaves the pro-apoptotic Bcl-2 family member, BH3-only protein, Bid.<sup>18,19</sup> Truncated Bid (tBid) disrupts the outer mitochondrial membrane (OMM) in a Bax and/or Bak-dependent manner to cause the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), the release of the proapoptotic factors such as cytochrome c and second mitochondrial activator of caspases (Smac), leading to the activation of caspase-9 in the "apoptosome" followed by caspase-3 activation, DNA fragmentation, and target cell apoptosis.<sup>20</sup> GzmB also induces cell death in a reactive oxygen species (ROS)-dependent manner. Indeed, GzmB triggers an ROS increase in the target cell by directly attacking several subunits of the NADH:ubiquinone oxidoreductase complex inside the mitochondria. This leads to mitocentric ROS production, which is necessary for the optimal apoptogenic factor release from mitochondria in response to GzmB.<sup>21</sup> Moreover, this pathway is blocked by overexpression of important pro-survival Bcl-2 family proteins, including Bcl-2 or Bcl-X<sub>1</sub>.<sup>22</sup> It has been also proposed that hGzmB can directly initiate effector caspases activation but cannot fully process pro-caspase 3 without disruption of the mitochondrial membrane and the release of Smac/Diablo and HtrA2/Omi that facilitate caspase 3 full activation by blocking the inhibitory action of IAPs (inhibitor of apoptosis proteins).23 Notably, mouse GzmB preferentially induces direct caspase 3 activation and triggers apoptosis in a Bid-/mitochondria-independent manner. Finally, it has been suggested that GzmB may induce target cell death in the absence of Bid, Bax, and Bak<sup>24</sup> by directly cleaving the inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD/DFF45) to free the endonuclease CAD/DFF4025, 26 and/or by cleaving several caspases<sup>27</sup> or non-caspase substrates.<sup>28</sup>

GzmA induces caspase-independent cell death and triggers single-stranded DNA cuts into large fragments that are much larger than the oligonucleosomal fragments generated during GzmB or caspase-induced cell death (Fig. 2).<sup>29</sup> In mitochondria, GzmA cleaves the electron transport chain complex I subunit Ndufs3, which interferes with mitochondrial redox function and generates superoxide anion.<sup>30,31</sup> These superoxides generated by damaged mitochondria drive an endoplasmic reticulum-associated stress response complex, known as the SET complex,<sup>32</sup> into the nucleus where it plays a key role in GzmA-induced nuclear damages and cell death.<sup>29</sup> The SET complex is formed by three nucleases: the base excision repair endonuclease Ape1 (apurinic/ apyrimidinic endonuclease 1), the 5'-3' exonuclease Trex1 (three prime repair exonuclease 1), and the



**FIG. 1:** GzmB-mediated apoptosis pathways. GzmB can trigger cell death by initiating the mitochondrial pathways by cleaving the BH3-only protein Bid. Truncated Bid promotes the oligomerization of Bax and/or Bak in the mitochondrial outer membrane (which can be inhibited by the anti-apoptotic protein Bcl-2), leading to the release of cytochrome c assembly of the "apoptosome" followed by caspase 3 activation and the cleavage of different death substrates including ICAD, the inhibitor of the endonuclease CAD. GzmB can also directly process procaspase 3 or ICAD and induces a mitocentric ROS production to promote apoptosis. Human GzmB preferentially operates through the Bid/mitochondrial pathway, whereas mouse GzmB preferentially induces direct caspase 3 activation.

endonuclease NM23-H1 (non-metastatic protein 23-homolog 1). The SET complex also contains the DNA binding protein that recognizes distorted DNA HMGB2 (high mobility group protein B2) and the chromatin modifying proteins SET (which also inhibits the endonuclease NM23-H1) and pp32.<sup>33–35</sup> GzmA, which enters to the nucleus via an unknown mechanism, cleaves SET, allowing NM23-H1 to nick DNA.<sup>34</sup> The exonuclease Trex1 then extends the break.<sup>33</sup> Simultaneously, GzmA cleaves and inactivates HMGB2 and Ape1, interfering with base

excision repair.<sup>35,36</sup> Moreover, GzmA interferes with the recognition of damaged DNA by cleaving Ku70 and poly-ADP-ribose polymerase (PARP).<sup>37,38</sup>

The mechanisms of action of other Gzms, so called "orphan" Gzms, are more obscure, although several substrates have been identified during the last decade.<sup>39</sup> GzmH has been mostly described to interfere with the replication of human adenovirus by cleaving a DNA binding protein and the adenovirus 100K assembly protein<sup>40,41</sup> but could also induce caspase-independent cell death with ROS generation,



**FIG. 2:** GzmA-mediated cell death pathways. In mitochondria, GzmA cleaves the electron transport chain complex I subunit Ndufs3, which interferes with mitochondrial redox function and generates ROS. These ROS drive the endoplasmic reticulum-associated stress response complex SET into the nucleus. GzmA also enters to the nucleus and cleaves the protein SET, allowing the endonuclease NM23-H1 to nick DNA. The exonuclease Trex1 then extends the break. Simultaneously, GzmA cleaves and inactivates HMGB2 and Ape1, interfering with base excision repair, and cleaves Ku70 and PARP interfering with the recognition of damaged DNA.

dissipation of  $\Delta \Psi m$ , chromatin condensation, and nuclear fragmentation.<sup>42</sup> GzmK has been reported to induce cell death via a process that is similar to both GzmA- and GzmB-mediated apoptosis. GzmK causes the cleavage of Bid, dissipation of  $\Delta \Psi m$ , MOMP with cytochrome c and EndoG release, but it seems to induce cell death independently of caspases.<sup>43</sup> Others reports have also shown that GzmK cleaves various GzmA substrates, including SET and Ape1, and also triggers ROS production, SET translocation to the nucleus, and DNA nicks.<sup>44,45</sup> Moreover, GzmK has been shown to cleave valsolin-containing proteins, which interfere with the endoplasmic reticulum (ER) unfolded protein response and promote caspaseindependent cytotoxicity.<sup>46</sup> Finally, independent groups have observed that GzmM induces cell death; even if the different published studies do not agree about the class of cell death triggered by this Gzm. It has been reported that GzmM induces caspaseindependent cell death that looked like lysis with large vacuoles observed, without MOMP, phosphatidyl serine exposure or DNA fragmentation.<sup>47,48</sup> In other studies, GzmM activated caspase-dependent cell death without Bid cleavage but with MOMP, cytochrome c release, ROS generation, phosphatidyl serine exposure, cleavage of the apoptosis inhibitor XIAP, and ICAD, followed by CAD activation and disruption of the microtubule network.<sup>49,50</sup>

#### B. The Death Receptor Pathway

Killer cells can also induce target cell apoptosis through the death-receptor apoptotic pathway (also called the extrinsic pathway).<sup>5,51–53</sup> Death receptors belong to the tumor necrosis factor (TNF) receptor (TNFR) superfamily. All members of this deathreceptor family are characterized by the presence of an intracellular 80 amino acid long motif, termed death domain (DD), that plays a key role in subsequent apoptotic signaling. The most extensively studied death receptors are FAS (CD95/APO-1), TNF-receptor 1 (TNF-R1/p55/CD120a), TRAIL receptor 1 (TRAIL-R1/DR4), and receptor 2 (TRAIL-R2/DR5), but two additional receptors are present in humans (Death Receptors 3 (DR3/APO-3) and 6 (DR6)).<sup>51</sup> These death receptors are activated by their cognate respective ligands, and all belong to the TNF family: Fas ligand (FasL /CD95L), TNFrelated apoptosis-inducing ligand (TRAIL), and TNF- $\alpha$ .<sup>2</sup> These ligands are expressed as type-II transmembrane, homotrimeric proteins at the surface of activated killer cells, but they can also be released as soluble ligands through the action of specific cell surface proteases.54,55 Schematically, upon ligation with their respective ligands, FAS, DR4, and DR5 trigger apoptosis in target cells but can eventually engage other pathways (NFkB, JNK/c-Jun, p38/ MAPK/AP-1 pathways) that promote cell survival or other cellular function, like inflammation.56,57 TNF-R1 mainly signals activation of the NFkB, JNK/c-Jun, p38/MAPK/AP-1 cascades, but they can also trigger cell death under certain circumstances.<sup>2,58,59</sup>

Apoptotic signal transduction by FAS, DR4, and DR5 proceeds through shared general steps (Fig. 3). Upon ligand binding, FAS, DR4, or DR5 multimerizes at the cell membrane,<sup>60, 61</sup> leading to a conformational change in the receptor's intracellular domain.<sup>62</sup> This leads to the recruitment of an adaptor protein, namely a Fas-associated protein with death domain (FADD), which contains both a DD that interacts with the receptor's DD, and a death effector domain (DED) that recruits initiator caspases (caspase 8 and caspase 10).63 The resulting complex is called death-inducing signaling complex (DISC).<sup>64</sup> Within the DISC, high local concentrations of the initiator caspases lead to the formation of homodimers involved in their activation<sup>65</sup> before their release to the cytoplasm, where they can cleave downstream substrate either via direct activation of the effector caspases 3 or 7 (mitochondria independent) or indirectly via mitochondria-dependent mechanisms. These two mechanisms correspond to the predominant arms of the death-receptor signaling pathway (especially for the CD95 signaling), both leading in fine to effector caspase 3 and caspase 7 activation, but these are thought to operate distinctly in two distinct types of cells. Cells using the direct activation of effector caspases by the initiator caspases 8/10 are known as type I cells (i.e., SW480 colon adenocarcinoma, SKW6.4 B lymphoblastoid, and H9 T lymphoma cells), whereas those using the mitochondrial amplification pathway (through the cleavage of Bid protein into truncated Bid, which links caspase 8/10 to the mitochondrial pathway) are known as type II cells (i.e., hepatocytes, Jurkat cells, and pancreatic  $\beta$  cells).<sup>66</sup> The basis of this cellular preference seems to depend on the relative stoichiometry of cleaved caspases 8 and 10 within the DISC and to the numbers of DISC present upon receptor/ligand interaction.67,68 Because type II cells depend on the mitochondrial branch, apoptosis can be blocked by the overexpression of Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub>.<sup>69</sup> Importantly, the activation of procaspase-8 in response to death-receptor triggering can also be inhibited by cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIP).<sup>70,71</sup> Homologous to caspase 8, cFLIP contains two DEDs and therefore can be recruited at the DISC via FADD. The cFLIP short isoform (cFLIP<sub>short</sub>) lacks the C-terminal caspase catalytic homology domain and therefore acts as a competitive inhibitor of caspase 8 recruitment to the DISC and prevents caspase 8 homodimers formation, inhibiting caspase 8 activation.72 The cFLIP long isoform (cFLIP<sub>long</sub>) contains a C-terminal caspase catalytic homology domain that lacks caspase activity, but it can modulate apoptosis in two opposite directions depending on its expression level, even if this point is still subject to debate. When expressed at a high



**FIG. 3:** Apoptotic signal transduction by the death domain receptors FAS, DR4 and DR5 proceeds through shared general steps. Upon ligand binding, FAS, DR4 or DR5 multimerize at the cell surface leading to a conformational change in the receptor's intracellular domain. This leads to the recruitment of the adaptor protein FADD, which contains both a death domain (DD) that interacts with the receptor's DD, and a death effector domain (DED) that recruits initiator pro-caspase 8. The resulting complex is called death inducing signaling complex (DISC). Within the DISC, high local concentrations of the initiator caspases lead to formation of homodimers involved in their activation before their release to the cytoplasm where they can cleave downstream substrates, either via direct activation of the effector caspases 3 (type I cells) or indirectly via the cleavage of Bid protein into truncated Bid, which links caspase 8 to the mitochondrial pathway (type II cells). Homologous to caspase 8, cFLIP acts as a competitive inhibitor of caspase 8 activation.

level,  $cFLIP_{long}$  inhibits the activation of procaspase 8 and thereby blocks the apoptosis initiation. In contrast, when expressed at a low level,  $cFLIP_{long}$  promotes procaspase 8 activation.<sup>52</sup>

## III. IMPLICATION OF P53 IN THE MODULATION OF CYTOTOXIC LYMPHOCYTES-MEDIATED CELL DEATH

# A. Transcriptional and Non-transcriptional Regulation of Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Stress-Induced p53

One of the most important and known apoptosis regulators is the tumor suppressor p53. In response to cellular stress, the p53 protein matures from a

latent to an active form. This stress is detected by various proteins, called "sensors." These proteins activate a cascade of events resulting in the stabilization, accumulation, and re-localization of p53. This model of quantitative activation (stabilization, accumulation) and qualitative localization (nuclear or mitochondrial translocation) involves covalent and noncovalent modifications that induce a conformational change of p53. At the present time, the majority of the proteins that govern the activation of the p53 are represented by kinases (ATM, DNA-PK, P38, JNK, CHK2, etc.), acetyl transferases (P300, CBP, etc.), and ubiquitin ligases (Mdm2, Mdm4).<sup>73</sup> In fact, upstream of the p53 protein, endogenous and exogenous DNA damages constitute a trigger for p53 protein activation and stabilization.

It has been well established that the wild-type tumor suppressor p53 (wtp53) acts as a stressactivated sequence-specific transcription factor that activates transcription from promoters carrying a p53 consensus binding site.74 As such, it protects cells from a variety of stress signals such as DNA damage, nucleotide depletion, oncogene activation, or  $\gamma$ -irradiation by regulating the transcription of genes involved in cell-cycle arrest, DNA repair, and apoptosis,75 thereby preventing cells from replicating a genetically compromised genome. Regarding apoptosis, p53 both positively regulates the expression of Bax, Bak, Bid, Puma, and Noxa and inhibits the expression of Bcl-2 or Bcl-X<sub>1</sub>,<sup>75-78</sup> which are important factors of MOMP in response to different apoptosis inducers.<sup>79</sup> P53 also positively regulates the expression of several microRNAs (miRs) including miR34, which negatively regulates the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and survivin.<sup>80</sup> Nevertheless, the activity of p53 in the regulation of apoptosis through MOMP is not limited to its activities as a transcription factor<sup>81</sup> and p53 has been shown to physically interact with several members of the Bcl-2 family.

As mentioned above, it is well known that the mitochondrial pathway and MOMP is regulated by several Bcl-2 family members.<sup>82</sup> Some BH3-only proteins (known as activators, i.e., Bid) mediate MOMP by physically interacting and activating the effector proteins Bax and/or Bak, whereas others

(known as de-repressors, i.e., Bad) act by displacing Bax and/or Bak from Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub>-mediated inhibition.83 In this context, the "activator" model postulates that some activator BH3-only proteins (i.e., tBid or Bim) transiently bind to Bax and induce conformational changes required for stable insertion in the OMM. In this model, Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> proteins sequester the activator BH3-only proteins and neutralize them.<sup>84</sup> On the other hand, the "inactivator" model proposes that the primary function of antiapoptotic protein Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> is to neutralize the pro-apoptotic effector proteins Bax and/or Bak by forming heterodimeric complexes,<sup>82,85</sup> limiting their capacity to form pores in the OMM. In this context, the direct role of p53 in the mitochondria has become evident as a major regulator of cell death induced by different kind of stress.<sup>81, 86</sup> Mihara et al. <sup>87</sup> reported that p53 protein can directly induce MOMP by forming complexes with the protective Bcl-X<sub>L</sub> or Bcl-2 proteins, resulting in cytochrome c release. Consistently, protein modeling, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and site-specific mutagenesis experiments have identified the region of interaction between Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> proteins and p53 as its DNA-binding domain (DBD).88-91 Moreover, it has been demonstrated that Bcl-X<sub>I</sub> conformational change upon binding to wild-type (wt) p53 (but not mutant p53) facilitates the dissociation of  $Bcl-X_{I}$ Bax complexes.<sup>89</sup> In this model, the formation of  $p53/Bcl-X_L$  or Bcl-2 complexes antagonizes Bcl- $X_L/$ Bcl-2 function of keeping Bax and Bak inactive, and leads to their activation and oligomerization. P53 can also accumulate in the cytoplasm, where it directly activates the pro-apoptotic protein Bax in a "hit and run" manner to induce mitochondrial release of apoptogenic factors.92 In parallel, it has also been proposed that stress-induced p53 is initially bound to cytosolic Bcl-X<sub>L</sub> but that transcriptionally induced Puma liberates p53 from this interaction, thereby allowing p53 to interact with Bak/Bax to initiate apoptosis.93,94 Moreover, a study also demonstrated that p53 binding to mitochondrial Bak is necessary for its release from Mcl-1 (another antiapoptotic member of the Bcl-2 family) and further oligomerization.95 Finally, it has also been proposed that mitochondrial p53 could function as an enabler

BH3-only protein to prevent an activator, like tBid, to interact with the anti-apoptotic protein Bcl-2, Bcl- $X_L$  or Mcl-1.<sup>89,96</sup>

Taken together, the different studies mentioned above demonstrate the key role of p53 in the induction/regulation of stress-induced apoptosis, which in particular has been reported to contribute to the sensitivity of tumor cell to apoptosis induced by many anti-cancer agents and by radiotherapy. However, the role of this tumor suppressor protein in the control of killer cell-mediated cytotoxicity is not well documented.

## B. Role of p53 in Granzyme-Induced Cell Death

A few studies have established a link between p53 and tumor cell susceptibility to Gzms-induced cell death. Fan et al. demonstrated that p53 is a physiological target of GzmK and is cleaved at Lys<sup>24</sup> and Lys<sup>305</sup> to generate three fragments: p40, p35, and p13 (Fig. 4, right panel).97 All three cleavage fragments exert pro-apoptotic activity. P40 and p35 display both nuclear and mitochondrial localization, which might be related to cell-death induction, while p13 localizes to the nucleus to exert pro-apoptotic activity. Moreover, p35 and p13 display no or weak transcriptional activity, while p40 induces the expression of some p53 target genes, including p21, Mdm2, and Puma, suggesting that both transcriptional and nontranscriptional (mitochondrial) p53 activity might be important features in the induction of GzmKdependent cell death. Importantly, p53 expression seems to be crucial for GzmK-mediated and NK cell-dependent cell death, as shown by the differential susceptibility of colon carcinoma cell line HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> to both GzmK- and NK cell-mediated lysis.

Our group also recently described a relationship between p53 and hGzmB-induced apoptosis. We demonstrated that both killer cells and hGzmB induce rapid stabilization and activation of p53 within target cells.<sup>98</sup> HGzmB triggers the rapid translocation of a small fraction of the endonuclease CAD to the nucleus in a Bid- and caspase 3-independent manner, which triggers early DNA damage. An ataxia telangiectasia

mutated (ATM)-related genotoxic stress-activated kinase belonging to the phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase)-related kinases (PIKK) family, named hSMG-1,99 is then rapidly activated in response to hGzmB-induced early DNA damage and would be, at least in part, responsible for a rapid wtp53 phosphorylation, stabilization, and activation in a melanoma target model following interaction with autologous CTL clones or after hGzmB treatment.<sup>100</sup> Furthermore, RNA interference-mediated inhibition of p53 significantly decreased targeted cell death induced by both CTLs and hGzmB, which shows that p53 is an important determinant of hGzmB-induced cell death.98 More recently, we demonstrated that hGzmB-activated p53 translocates to the target-cell mitochondria outer membrane and interacts with the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Fig. 4, left panel).<sup>101</sup> This interaction prevents the Bcl-2 inhibitory effect on both Bax and hGzmB-truncated Bid and promotes hGzmB-induced mitochondrial outer membrane permeabilization. Thus, in response to hGzmB, p53 favors the release of mitochondrial non-activated Bax from Bcl-2 interaction, promoting its activation by tBid, but might also facilitate the dissociation of Bcl-2/activated Bax complex, promoting both Bax activation and oligomerization. In this scenario, hGzmB-induced mitochondrial p53 operates as a BH3-only protein of the "de-repressor" type freeing pro-apoptotic tBid and Bax from Bcl-2-mediated inhibition, and the non transcriptional activity of p53 seems to have the predominant role in the modulation of GzmB-induced cell death. Consequently, the inhibition of p53 mitochondrial translocation and p53-Bcl-2 interaction decrease hGzmB-induced Bax activation, MOMP, cytochrome c release and subsequent effector caspases activation, leading to a decreased sensitivity of target cells to both hGzmB and CTL/NK-mediated cell death.<sup>101</sup>

In summary, to some extent, both transcriptional and non-transcriptional p53 activities seem to be important for target-cell susceptibility to GzmK and hGzmB, and consequently for CTL/NK-mediated cell death. To date, no studies have involved p53 in cell death induced by the others Gzms (GzmA, H, or M). However, given the fact that some of them can induce target cell MOMP by unknown mechanisms,



**FIG. 4:** Implication of p53 in GzmB and GzmK-induced cell death. GzmB induces the accumulation of p53 on target cell mitochondria where it interacts with the pro-survival protein Bcl-2. This interaction allows the release of the pro-apoptotic protein Bax from its inhibitory interaction with Bcl-2 and prevents GzmB-activated tBid sequestration by Bcl-2. In this case, free tBid activates free Bax to induce MOMP, cytochrome c release, and apoptosis. GzmK induces the cleavage of p53 to generate three fragments: p40, p35, and p13. All the three cleavage fragments exert pro-apoptotic activity. P40 and p35 display both a nuclear and mitochondrial localization, which might be involved in MOMP, while p13 localizes to the nucleus to exert pro-apoptotic activity. P35 and p13 display no or weak transcriptional activity, while p40 induces the expression of some p53 target genes, including p21, Mdm2, and Puma.

further studies are required to determine whether p53 might be involved in the cell death induced by these Gzms.

## C. Role of p53 in Death Receptors-Mediated Apoptosis

Cell death induced through death receptors has been widely studied, especially using recombinant soluble ligands. Clinical studies evaluating the antitumoral effect of TNF- $\alpha$  and FasL were initiated decades ago, and more recently, TRAIL has gained interest, mostly due to its ability to induce apoptosis of transformed but not normal cells.<sup>102</sup> Based on these studies, cross talk between p53 and death-receptor–induced cell death has been described, even if the TNF family can also clearly engage apoptosis in a p53-independent

manner.<sup>103,104</sup> Moreover, several lines of evidence suggest that p53 upregulates the expression of the death receptors Fas, DR4, and DR5, and thus might also mediate apoptosis in part via Fas and/or DR4/ DR5.<sup>105-108</sup> For example, under genotoxic stress, p53 may sensitize tumor cells to TRAIL-induced apoptosis through the upregulation of DR4/5 but also by regulating the expression of important pro- and anti-apoptotic proteins (described above) to enhance their sensitivity to the intrinsic pathway.<sup>109,110</sup> It has also been demonstrated that TRAIL itself is a p53 target gene.<sup>111</sup> Similarly, restoring the wtp53 function in tumor cells expressing a mutated p53 (mtp53) or overexpressing Mdm2 can sensitize them to TRAIL-induced cell death,<sup>112-114</sup> TNFα-induced cell death,<sup>115-118</sup> and FasL-induced<sup>119,120</sup> cell death. As such, targeting p53 might serve as an effective strategy for sensitizing tumor cells to TNF family ligand-induced apoptosis.

As mentioned above, the molecular mechanisms underlying this p53-dependent sensitization of target cells to the death receptor-induced apoptosis mainly depend on the transcriptional activation by p53 of the death receptors themselves and by the modulation of the expression level of key pro- and anti-apoptotic proteins, especially from the Bcl-2 family (e.g., Bax, Bcl-2, Bcl-X<sub>1</sub>, etc.). However, these studies mainly used soluble ligands from the TNF family and might not reflect cytotoxic lymphocytemediated triggering of the death-receptor pathway. Nevertheless, our group demonstrated that the restoration of a wtp53 function in a lung carcinoma model, harboring a mtp53, restores the expression of the Fas receptor at the cell surface and sensitizes tumor cells to CTL-mediated apoptosis through the Fas/FasL pathway.<sup>121</sup> Furthermore, in this model the effect of wtp53 on the Fas-mediated apoptosis also involves the inhibition of cFLIP<sub>Short</sub> expression, resulting in an efficient pro-caspase 8 activation in target cells after CTL attack.<sup>122</sup> Interestingly, the observed effect of p53 might be dependent on an ubiquitine- or proteasome-dependent degradation of cFLIP<sub>Short</sub> triggered by p53.<sup>123</sup> These results indicate that an activated p53 might also be important in the regulation of CTL/NK-induced apoptosis through the death-receptor pathway. However, further studies are clearly needed to clarify this point.

#### **IV. CONCLUDING REMARKS**

It has become increasingly clear that the understanding of the cell death mechanisms triggered by immune effector cells will allow us to define more precisely the signaling pathway triggered by CTL and NK cells to destroy their targets, but it could also have several future clinical applications. In this context, the p53 protein is of particular interest based on its role in the regulation of GzmB, GzmK as well as death receptors-induced apoptosis. Notably, it seems that p53 plays different roles in CTL-/NK-mediated cell death. GzmB triggers the stabilization and activation of p53, which in turn facilitates the MOMP induced by the GzmB-dependent cleavage of Bid. GzmK directly attacks p53 through its cleavage to promote cell death. Finally, it seems that a stressinduced activation of p53 in target cells sensitizes them to apoptosis through the death receptor pathway, at least under certain circumstances.

Furthermore, p53 is not only involved in the regulation of the signaling pathway activated by effector cells to kill their target. For example, a direct link between p53 expression and target recognition by NK cells was recently revealed. The activation of p53 in lung-cancer cell lines strongly upregulates the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2, resulting in NK cell activation.<sup>124</sup> P53 also contributed to phagocytosis of apoptotic cells through the upregulation of its target gene DD1 $\alpha$  (death domain 1 $\alpha$ ) and ensures efficient generation of a precise immune response.<sup>125</sup> In contrast, it was also recently demonstrated that the downmodulation of p53 in response to antigen stimulation is critical for antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation.<sup>126</sup>

Importantly, approximately half of human cancers have inactivating mutations of the p53 tumor suppressor gene, and most of the remaining malignancies deactivate the p53 pathway by increasing its inhibitors, reducing its activators, or inactivating its downstream targets. These mutations, resulting in stabilization and accumulation of high level of a defective p53 product, result in loss of p53 functions, and the mutant proteins are frequently functionally compromised for apoptosis induction in response to different kind of stress. Whether these p53 mutations facilitate tumor-cell escape to CTL/NK-mediated lysis through the GzmB, GzmK or death receptors pathways is unclear. In particular, it has been demonstrated that wtp53, but not tumor-derived p53 mutants, binds to Bcl-2 via this DBD and can trigger MOMP.90 Because of the results pointing out the importance of Bcl-2/wtp53 interaction in hGzmB-induced apoptosis, further studies will be important to determine whether such p53 mutants can be associated with a tumor cell resistance to PFN/ hGzmB- and CTL/NK-mediated cell death. Similarly, inactivation of p53 transcriptional activity could be associated with a tumor-cell resistance to CTL/NKmediated lysis via the FasL and TRAIL pathways. If this scenario is correct, reactivating p53 might represent an effective strategy for sensitizing tumor cells to CTL-/NK-mediated lysis. During the past decade, several novel molecules have been identified based on their properties to restore wtp53 conformation and function of mutant p53 proteins and triggers apoptosis (PRIMA-1, MIRA-1, STIMA-1, CP-31398, etc.).127 Recent studies also have shown in vitro and in vivo that RITA and Nutlin-3a,128 two inhibitors of Mdm2-p53 interaction, allow the reactivation of the p53 pathway in Mdm2 overexpressing tumor cells. Because the clinical use of these molecules to restore p53 function could be a novel strategy to optimize the immunotherapy against cancer by increasing the CTL/NK-mediated killing of tumor cells, the effect of these molecules on CTL/NK-, FasL-, TRAIL- and GzmB-dependent cytotoxicity in different tumor models expressing a mutated p53 should be tested.

# ACKNOWLEDGMENTS

The authors are supported by the "Ligue Nationale contre le Cancer" (LNCC-Equipe Labéllisée), the "Association pour la Recherche contre le Cancer" (ARC) and INSERM. T.B.S. is supported by a PhD training fellowship from the "Association pour la Recherche contre le Cancer" (ARC). L.Z. is supported by a PhD training fellowship from the "Ligue Nationale contre le Cancer" (LNCC).

## REFERENCES

- 1. Lieberman J. Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. Immunol Revs. 2010;235(1):5–9. Epub 2010/06/12.
- Ashkenazi A, Salvesen G. Regulated Cell Death: Signaling and mechanisms. Annual Rev Cell Dev Biology. 2014;30:337–56. Epub 2014/08/26.
- van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. J Exp Med. 1996;184(5):1781–90. Epub 1996/11/01.
- 4. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin

and granzymes: function, dysfunction and human pathology. Nature Rev. 2015;15(6):388–400. Epub 2015/05/23.

- Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG, Grandien A. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. J Immunol. 2001;167(4):2068–73. Epub 2001/08/08.
- 6. Ewen CL, Kane KP, Bleackley RC. A quarter century of granzymes. Cell Death Differ. 2012;19(1):28–35. Epub 2011/11/05.
- Susanto O, Trapani JA, Brasacchio D. Controversies in granzyme biology. Tissue Antigens. 2012;80(6):477–87. Epub 2012/11/10.
- 8. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nature Rev. 2003;3(5):361–70.
- Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. Front Immunol. 2012;3:335. Epub 2012/11/20.
- Thiery J, Lieberman J. Perforin: A key poreforming protein for immune control of viruses and cancer. Subcell Biochem. 2014;80:197–220. Epub 2014/05/07.
- Rousalova I, Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). Int J Oncol. 2010;37(6):1361–78.
- 12. Raja SM, Metkar SS, Honing S, Wang B, Russin WA, Pipalia NH, Menaa C, Belting M, Cao X, Dressel R, Froelich CJ. A novel mechanism for protein delivery: granzyme B undergoes electrostatic exchange from serglycin to target cells. J Biol Chem. 2005;280(21):20752–61. Epub 2005/03/25.
- Thiery J, Keefe D, Boulant S, Boucrot E, Walch M, Martinvalet D, Goping IS, Bleackley RC, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. Nature Immun. 2011;12(8):770–7. Epub 2011/06/21.
- Thiery J, Keefe D, Saffarian S, Martinvalet D, Walch M, Boucrot E, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzymemediated apoptosis. Blood. 2010;115(8):1582–93.
- Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA, D'Angelo ME, Orlova EV, Coulibaly F, Verschoor S, Browne KA, Ciccone A, Kuiper MJ, Bird PI, Trapani JA,

Saibil HR, Whisstock JC. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. Nature. 2010;468(7322):447–51. Epub 2010/11/03.

- Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. Annual Rev Immuny. 2008;26:389-420. Epub 2008/02/29.
- Anthony DA, Andrews DM, Watt SV, Trapani JA, Smyth MJ. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. Immunol Rev. 2010;235(1):73–92. Epub 2010/06/12.
- Heibein JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, Bleackley RC. Granzyme B-mediated cytochrome C release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax. J Exp Med. 2000;192(10):1391–402.
- Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA, Trapani JA. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. J Exp Med. 2000;192(10):1403–14. Epub 2000/11/21.
- Wang GQ, Wieckowski E, Goldstein LA, Gastman BR, Rabinovitz A, Gambotto A, Li S, Fang B, Yin XM, Rabinowich H. Resistance to granzyme B-mediated cytochrome C release in Bak-deficient cells. J Exp Med. 2001;194(9):1325–37. Epub 2001/11/07.
- Jacquemin G, Margiotta D, Kasahara A, Bassoy EY, Walch M, Thiery J, Lieberman J, Martinvalet D. Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. Cell Death and Differentiation. 2014. Epub 2014/11/02.
- Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, Newmeyer DD, Bleackley RC, Green DR. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. J Biol Chem. 2001;276(15):12060–7. Epub 2001/03/30.
- 23. Sutton VR, Wowk ME, Cancilla M, Trapani JA. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. Immunity. 2003;18(3):319–29.
- Thomas DA, Scorrano L, Putcha GV, Korsmeyer SJ, Ley TJ. Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of Bid, Bax, and Bak. Proc Nat Acad Sci U S A. 2001;98(26):14985–90.

- Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, Ley TJ. Dff45/Icad can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. Immunity. 2000;12(6):621–32. Epub 2000/07/14.
- Sharif-Askari E, Alam A, Rheaume E, Beresford PJ, Scotto C, Sharma K, Lee D, DeWolf WE, Nuttall ME, Lieberman J, Sekaly RP. Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated dnase release and DNA fragmentation. EMBO J. 2001;20(12):3101–13. Epub 2001/06/19.
- Andrade F, Roy S, Nicholson D, Thornberry N, Rosen A, Casciola-Rosen L. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for Ctl-induced apoptosis. Immunity. 1998;8(4):451–60. Epub 1998/05/20.
- Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. Proc of National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98(10):5746–51. Epub 2001/05/02.
- 29. Lieberman J. Granzyme a activates another way to die. Immunol Rev. 2010;235(1):93–104. Epub 2010/06/12.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme a induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. Immunity. 2005;22(3):355–70. Epub 2005/03/23.
- 31. Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J. Granzyme a cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. Cell. 2008;133(4):681–92. Epub 2008/05/20.
- 32. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, Jaju M, Lieberman J. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. J Biol Chem. 2001;276(46):43285–93. Epub 2001/09/14.
- 33. Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, Zhang D, Sung JS, Demple B, Perrino FW, Lieberman J. The Exonuclease Trex1 is in the set complex and acts in concert with Nm23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. Molec Cell. 2006;23(1):133–42. Epub 2006/07/05.
- 34. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor Nm23-H1 is a granzyme A-activated dnase during Ctl-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein set is

its inhibitor. Cell. 2003;112(5):659–72. Epub 2003/03/12.

- 35. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Lieberman J. Hmg2 interacts with the nucleosome assembly protein set and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. Molec Cell Biol. 2002;22(8):2810–20. Epub 2002/03/23.
- 36. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Xu Z, Novina CD, Yoshida A, Pommier Y, Lieberman J. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. Nature Immunol. 2003;4(2):145–53. Epub 2003/01/14.
- 37. Zhu P, Martinvalet D, Chowdhury D, Zhang D, Schlesinger A, Lieberman J. The cytotoxic T lymphocyte protease granzyme A cleaves and inactivates poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase-1. Blood. 2009;114(6):1205–16. Epub 2009/06/10.
- Zhu P, Zhang D, Chowdhury D, Martinvalet D, Keefe D, Shi L, Lieberman J. Granzyme A, which causes single-stranded DNA Damage, targets the double-strand break repair protein KU70. EMBO reports. 2006;7(4):431–7. Epub 2006/01/28.
- Bovenschen N, Kummer JA. Orphan granzymes find a home. Immunolog Rev. 2010;235(1):117–27. Epub 2010/06/12.
- Andrade F, Fellows E, Jenne DE, Rosen A, Young CS. Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. EMBO J. 2007;26(8):2148–57. Epub 2007/03/17.
- 41. Andrade F. Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state. Immunolog Rev. 2010;235(1):128–46. Epub 2010/06/12.
- 42. Fellows E, Gil-Parrado S, Jenne DE, Kurschus FC. Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. Blood. 2007;110(2):544–52. Epub 2007/04/06.
- 43. Zhao T, Zhang H, Guo Y, Fan Z. Granzyme K directly processes bid to release cytochrome C and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. J Biol Chem. 2007;282(16):12104–11. Epub 2007/02/20.
- 44. Zhao T, Zhang H, Guo Y, Zhang Q, Hua G, Lu H, Hou Q, Liu H, Fan Z. Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein set to induce single-stranded DNA nicks of target cells. Cell Death Differ. 2007;14(3):489–99. Epub 2006/09/30.

- 45. Guo Y, Chen J, Zhao T, Fan Z. Granzyme K degrades the redox/DNA repair enzyme ape1 to trigger oxidative stress of target cells leading to cytotoxicity. Molecular Immunology. 2008;45(8):2225–35. Epub 2008/01/09.
- Guo Y, Chen J, Shi L, Fan Z. Valosin-containing protein cleavage by granzyme K accelerates an endoplasmic reticulum stress leading to caspaseindependent cytotoxicity of target tumor cells. J Immunol. 2010;185(9):5348–59. Epub 2010/09/30.
- 47. Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, Browne KA, Ellis S, Trapani JA, Smyth MJ. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. J Biol Chem. 2004;279(21):22236–42. Epub 2004/03/19.
- 48. Bovenschen N, de Koning PJ, Quadir R, Broekhuizen R, Damen JM, Froelich CJ, Slijper M, Kummer JA. NK cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network. J Immunol. 2008;180(12):8184–91. Epub 2008/06/05.
- Lu H, Hou Q, Zhao T, Zhang H, Zhang Q, Wu L, Fan Z. Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated Dnase (Cad) to unleash cad leading to DNA fragmentation. J Immunol. 2006;177(2):1171–8. Epub 2006/07/05.
- 50. Hu D, Liu S, Shi L, Li C, Wu L, Fan Z. Cleavage of survivin by granzyme M triggers degradation of the survivin-X-linked inhibitor of apoptosis protein (Xiap) complex to free caspase activity leading to cytolysis of target tumor cells. J Biol Chem. 2010;285(24):18326–35. Epub 2010/04/22.
- Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. Nature Immunol. 2009;10(4):348–55. Epub 2009/03/20.
- Lavrik IN. Systems biology of death receptor networks: live and let die. Cell Death Dis. 2014;5:e1259. Epub 2014/05/31.
- Falschlehner C, Schaefer U, Walczak H. Following Trail's path in the immune system. Immunology. 2009;127(2):145–54. Epub 2009/05/30.
- Ehrlich S, Infante-Duarte C, Seeger B, Zipp F. Regulation of soluble and surface-bound Trail in human T cells, B cells, and monocytes. Cytokine. 2003;24(6):244–53. Epub 2003/11/12.
- 55. Mohan MJ, Seaton T, Mitchell J, Howe A, Blackburn K, Burkhart W, Moyer M, Patel I, Waitt GM, Becherer JD, Moss ML, Milla ME. The tumor necrosis factor-alpha converting

enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. Biochemistry. 2002;41(30):9462–9. Epub 2002/07/24.

- 56. Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, Lawrence D, Renz M, Vucic D, Ashkenazi A. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. J Biol Chem. 2005;280(49):40599–608. Epub 2005/10/18.
- 57. Neumann L, Pforr C, Beaudouin J, Pappa A, Fricker N, Krammer PH, Lavrik IN, Eils R. Dynamics within the Cd95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. Molec Sys Biol. 2010;6:352. Epub 2010/03/10.
- Micheau O, Tschopp J. Induction of Tnf receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell. 2003;114(2):181–90. Epub 2003/07/31.
- 59. Walczak H. Tnf and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. Immunol Revs. 2011;244(1):9–28. Epub 2011/10/25.
- Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. Science 2000;288(5475):2354–7. Epub 2000/07/06.
- 61. Feig C, Tchikov V, Schutze S, Peter ME. Palmitoylation of Cd95 facilitates formation of sds-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. EMBO J. 2007;26(1):221–31. Epub 2006/12/13.
- 62. Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, Robinson H, Salvesen GS, Schwarzenbacher R, Riedl SJ. The Fas-Fadd death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. Nature. 2009;457(7232):1019– 22. Epub 2009/01/02.
- 63. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. Fadd/ Mort1 and caspase-8 are recruited to Trail receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by Trail receptor 2. Immunity. 2000;12(6):599–609. Epub 2000/07/14.
- 64. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicitydependent Apo-1 (Fas/Cd95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. 1995;14(22):5579–88. Epub 1995/11/15.

- Mace PD, Riedl SJ. Molecular cell death platforms and assemblies. Curr Opin Cell Biol. 2010;22(6):828–36. Epub 2010/09/08.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two Cd95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. 1998;17(6):1675–87. Epub 1998/05/02.
- 67. Schleich K, Warnken U, Fricker N, Ozturk S, Richter P, Kammerer K, Schnolzer M, Krammer PH, Lavrik IN. Stoichiometry of the cd95 deathinducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model. Molec Cell. 2012;47(2):306–19. Epub 2012/06/12.
- Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of Cd95/ Fas signaling at the DISC. Cell Death Differ. 2012;19(1):36–41. Epub 2011/11/15.
- 69. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in Cd95 type I and type II cells. J Biol Chem. 1999;274(32):22532–8. Epub 1999/07/31.
- Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-Flice, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and Cd-95-induced apoptosis. J Biol Chem. 1997;272(28):17255–7. Epub 1997/07/11.
- Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular flip. Nature. 1997;388(6638):190–5. Epub 1997/07/10.
- Ozturk S, Schleich K, Lavrik IN. Cellular flice-like inhibitory proteins (C-flips): fine-tuners of life and death decisions. Exp Cell Res. 2012;318(11):1324– 31. Epub 2012/02/09.
- Kruse JP, Gu W. Modes of P53 Regulation. Cell. 2009;137(4):609–22. Epub 2009/05/20.
- el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. Nature Genet. 1992;1(1):45–9.
- Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. Cell. 2009;137(3):413– 31. Epub 2009/05/05.
- Nakano K, Vousden KH. Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by P53. Molec Cell. 2001;7(3):683– 94. Epub 2001/07/21.
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor P53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene. Cell. 1995;80(2):293–9. Epub 1995/01/27.

- 78. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a Bh3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of P53-induced apoptosis. Science (New York, NY. 2000;288(5468):1053-8. Epub 2000/05/12.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The Bcl-2 family reunion. Molecular Cell. 2010;37(3):299–310. Epub 2010/02/18.
- Hermeking H. Micrornas in the P53 Network: micromanagement of tumour suppression. Nature Rev Cancer. 2012;12(9):613–26. Epub 2012/08/18.
- Speidel D. Transcription-Independent P53 Apoptosis: an alternative route to death. Trends Cell Biol. 2010;20(1):14–24. Epub 2009/11/03.
- Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: Bcl-2 family proteins and apoptosis. Cell Death Differ. 2014;21(2):206–15. Epub 2013/10/29.
- Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Pinti M, Kroemer G. Mitochondrial liaisons of p53. Antiox Redox Signal. 2011;15(6):1691–714. Epub 2010/08/18.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. Bcl-2, Bcl-X(L) sequester Bh3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. Molec Cell. 2001;8(3):705–11. Epub 2001/10/05.
- Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, Dillon CP, Green DR. A unified model of mammalian Bcl-2 protein family interactions at the mitochondria. Molec Cell. 2011;44(4):517–31. Epub 2011/11/01.
- Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM. Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. EMBO J. 2007;26(4):923–34. Epub 2007/02/03.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. Molec Cell. 2003;11(3):577–90.
- Petros AM, Gunasekera A, Xu N, Olejniczak ET, Fesik SW. Defining the p53 DNA-binding domain/ Bcl-X(L)-binding interface using nmr. FEBS Letts. 2004;559(1–3):171–4. Epub 2004/02/13.
- Hagn F, Klein C, Demmer O, Marchenko N, Vaseva A, Moll UM, Kessler H. Bclxl changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. J Biol Chem. 2010;285(5):3439–50. Epub 2009/12/04.

- 90. Tomita Y, Marchenko N, Erster S, Nemajerova A, Dehner A, Klein C, Pan H, Kessler H, Pancoska P, Moll UM. Wt p53, but not tumor-derived mutants, bind to bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. J Biol Chem. 2006;281(13):8600–6. Epub 2006/01/31.
- Follis AV, Llambi F, Ou L, Baran K, Green DR, Kriwacki RW. The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53. Nature Struct Molec Biol. 2014;21(6):535–43. Epub 2014/05/13.
- 92. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. Science. 2004;303(5660):1010-4.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR. Puma couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. Science. 2005;309(5741):1732–5.
- Vousden KH. Apoptosis. P53 and Puma: a deadly duo. Science. 2005;309(5741):1685–6. Epub 2005/09/10.
- 95. Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. Nature Cell Biol. 2004;6(5):443–50. Epub 2004/04/13.
- 96. Han J, Goldstein LA, Hou W, Gastman BR, Rabinowich H. Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. J Biol Chem. 2010;285(29):22473–83. Epub 2010/04/21.
- Hua G, Wang S, Zhong C, Xue P, Fan Z. Ignition of P53 bomb sensitizes tumor cells to granzyme K-mediated cytolysis. J Immunol. 2009;182(4):2152–9. Epub 2009/02/10.
- Meslin F, Thiery J, Richon C, Jalil A, Chouaib S. Granzyme B-induced cell death involves induction of p53 tumor suppressor gene and its activation in tumor target cells. J Biol Chem. 2007;282(45):32991–9.
- 99. Brumbaugh KM, Otterness DM, Geisen C, Oliveira V, Brognard J, Li X, Lejeune F, Tibbetts RS, Maquat LE, Abraham RT. The Mrna surveillance protein hsmg-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. Molec Cell. 2004;14(5):585–98. Epub 2004/06/04.
- Meslin F, Hamai A, Mlecnik B, Rosselli F, Richon C, Jalil A, Wemhoff G, Thiery J, Galon J, Chouaib

S. Hsmg-1 is a granzyme B-associated stressresponsive protein kinase. J Molecular Med (Berlin, Germany). 2011;89(4):411–21.

- 101. Ben Safta T, Ziani L, Favre L, Lamendour L, Gros G, Mami-Chouaib F, Martinvalet D, Chouaib S, Thiery J. Granzyme B-activated p53 interacts with bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. J Immunol. 2014. Epub 2014/11/19.
- Micheau O, Shirley S, Dufour F. Death receptors as targets in cancer. Brit J Pharmacol. 2013;169(8):1723–44. Epub 2013/05/04.
- Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2008;19(3-4):325–31. Epub 2008/05/23.
- 104. Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and trail receptor pathway. Oncogene. 2008;27(48):6207–15. Epub 2008/10/22.
- 105. Liu X, Yue P, Khuri FR, Sun SY. P53 Upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. Cancer Res. 2004;64(15):5078–83. Epub 2004/08/04.
- Takimoto R, El-Deiry WS. Wild-type p53 transactivates the killer/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. Oncogene. 2000;19(14):1735–43. Epub 2000/04/25.
- 107. Henry RE, Andrysik Z, Paris R, Galbraith MD, Espinosa JM. A Dr4:Tbid axis drives the p53 apoptotic response by promoting oligomerization of poised bax. EMBO J. 2012;31(5):1266–78. Epub 2012/01/17.
- 108. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/Apo-1 expression. Molec Cell Biol. 1995;15(6):3032–40. Epub 1995/06/01.
- 109. Zhao J, Lu Y, Shen HM. Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing trailinduced apoptosis in cancer cells. Cancer Letts. 2012;314(1):8–23. Epub 2011/10/28.
- 110. Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Tanaka Y, Sakai T, Miyoshi J, Maehara Y, Kitajima S. Key role of Atf3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. Oncogene. 2012;31(17):2210–21. Epub 2011/09/20.
- 111. Kuribayashi K, Krigsfeld G, Wang W, Xu J, Mayes PA, Dicker DT, Wu GS, El-Deiry WS. Tnfsf10 (Trail), a p53 target gene that mediates

p53-dependent cell death. Cancer Biol Ther. 2008;7(12):2034–8. Epub 2008/12/25.

- 112. Weinmann L, Wischhusen J, Demma MJ, Naumann U, Roth P, Dasmahapatra B, Weller M. A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2l/trail-induced apoptosis. Cell Death Differ. 2008;15(4):718–29. Epub 2008/01/19.
- 113. Carter BZ, Mak DH, Schober WD, Dietrich MF, Pinilla C, Vassilev LT, Reed JC, Andreeff M. triptolide sensitizes aml cells to trail-induced apoptosis via decrease of Xiap and p53-mediated increase of DR5. Blood. 2008;111(7):3742–50. Epub 2008/01/12.
- 114. Meijer A, Kruyt FA, van der Zee AG, Hollema H, Le P, ten Hoor KA, Groothuis GM, Quax WJ, de Vries EG, de Jong S. Nutlin-3 preferentially sensitises wild-type p53-expressing cancer cells to DR5-selective trail over RHTrail. British J Cancer. 2013;109(10):2685–95. Epub 2013/10/19.
- 115. Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Amor-Gueret M, Feunteun J, Larsen AK, Paillerets BB, Chouaib S. Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. Oncogene. 1997;15(23):2817– 26. Epub 1998/01/07.
- 116. Ameyar M, Shatrov V, Bouquet C, Capoulade C, Cai Z, Stancou R, Badie C, Haddada H, Chouaib S. Adenovirus-mediated transfer of wild-type p53 gene sensitizes TNF-resistant MCF7 derivatives to the cytotoxic effect of this cytokine: relationship with c-myc and rb. Oncogene. 1999;18(39):5464–72. Epub 1999/09/28.
- 117. Ameyar-Zazoua M, Larochette N, Dorothee G, Daugas E, Haddada H, Gouloumet V, Metivier D, Stancou R, Mami-Chouaib F, Kroemer G, Chouaib S. Wild-type p53 induced sensitization of mutant p53 TNF-resistant cells: role of caspase-8 and mitochondria. Cancer Gene Therapy. 2002;9(3):219–27. Epub 2002/03/16.
- 118. Muret J, Hasmim M, Stasik I, Jalil A, Mallavialle A, Nanbakhsh A, Lacroix L, Billot K, Baud V, Thiery J, Vielh P, Terrier P, Wiels J, Vassilev L, Lecesne A, Bonvalot S, Chouaib S. Attenuation of soft-tissue sarcomas resistance to the cytotoxic action of TNF-Alpha by restoring p53 function. PloS One. 2012;7(6):e38808. Epub 2012/06/22.
- Aguilar-Lemarroy A, Gariglio P, Whitaker NJ, Eichhorst ST, zur Hausen H, Krammer PH, Rosl F. Restoration of p53 expression sensitizes

human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. Oncogene. 2002;21(2):165–75. Epub 2002/01/23.

- 120. Senatus PB, Li Y, Mandigo C, Nichols G, Moise G, Mao Y, Brown MD, Anderson RC, Parsa AT, Brandt-Rauf PW, Bruce JN, Fine RL. Restoration of p53 function for selective fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells *in vitro* and *in vivo* by a p53 cooh-terminal peptide. Molecular Cancer Therapeutics. 2006;5(1):20–8. Epub 2006/01/25.
- 121. Thiery J, Dorothee G, Haddada H, Echchakir H, Richon C, Stancou R, Vergnon I, Benard J, Mami-Chouaib F, Chouaib S. Potentiation of a tumor cell susceptibility to autologous ctl killing by restoration of wild-type p53 function. J Immunol. 2003;170(12):5919–26.
- 122. Thiery J, Abouzahr S, Dorothee G, Jalil A, Richon C, Vergnon I, Mami-Chouaib F, Chouaib S. P53 potentiation of tumor cell susceptibility to cytotoxic T lymphocyte involves fas and mitochondrial pathways. J Immunol. 2005;174(2):871–8.
- 123. Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kadowaki Y, Itoshima T, Takata Y, Kagawa S, Roth JA, Tschopp J, Tanaka N. Accelerated degradation of cellular flip protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. Oncogene.

2001;20(37):5225-31. Epub 2001/08/30.

- 124. Textor S, Fiegler N, Arnold A, Porgador A, Hofmann TG, Cerwenka A. Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the Nkg2d ligands Ulbp1 and Ulbp2. Cancer Research. 2011;71(18):5998–6009. Epub 2011/07/19.
- 125. Yoon KW, Byun S, Kwon E, Hwang SY, Chu K, Hiraki M, Jo SH, Weins A, Hakroush S, Cebulla A, Sykes DB, Greka A, Mundel P, Fisher DE, Mandinova A, Lee SW. Control of signalingmediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. Science 2015;349(6247):1261669. Epub 2015/08/01.
- 126. Watanabe M, Moon KD, Vacchio MS, Hathcock KS, Hodes RJ. Downmodulation of tumor suppressor p53 by T cell receptor signaling is critical for antigen-specific Cd4(+) T cell responses. Immunity. 2014;40(5):681–91. Epub 2014/05/06.
- 127. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. Nature Rev Cancer. 2009;9(12):862–73. Epub 2009/11/26.
- 128. Vassilev LT. Mdm2 inhibitors for cancer therapy. Trends Molec Med. 2007;13(1):23–31. Epub 2006/11/28.

#### RESUME

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) jouent un rôle central dans un processus complexe d'interaction entre les tumeurs et le stroma et favorisent la croissance tumorale. Des preuves émergentes suggèrent que ces fibroblastes sont impliqués dans l'altération de la réponse immune antitumorale. Cependant, les mécanismes immuno-modulateurs sous-jacents dépendants de ces fibroblastes ne sont encore que très partiellement définis. Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence que les fibroblastes associés au mélanome diminuent la susceptibilité des cellules tumorales de mélanome à la lyse induite par les cellules Natural killer (NK) par un mécanisme dépendant de la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMPs) actives. Cette sécrétion de MMPs réduit l'expression de deux ligands du récepteur activateur NKG2D, MICA/B, à la surface des cellules tumorales et diminue par conséquent l'activité cytotoxique des cellules NK dépendante de NKG2D contre les cellules tumorales de mélanome. D'autre part, grâce à une approche génomique globale, mon travail a montré que l'hypoxie au sein du stroma tumoral pourrait augmenter les capacités immuno-modulatrices des CAFs en modifiant l'expression d'un ensemble de gènes qui codent pour des protéines immunosuppressives. L'ensemble de ces résultats démontrent donc que les CAFs sont des déterminants essentiels modifiant la susceptibilité des cellules tumorales aux cellules tueuses mais qu'il existerait également un dialogue entre le microenvironnement hypoxique et les CAFs leur permettant d'augmenter leur potentiel immunosuppresseur.

#### SUMMARY

Cancer-associated fibroblasts (CAF) play a central role in a complex process of interaction between tumors and stroma and promote tumor growth. Emerging evidence suggest that these fibroblasts are involved in the alteration of the anti-tumor immune response. However, the underlying immunomodulatory mechanisms dependent on these fibroblasts are still only partially defined. During my thesis, I demonstrated that melanoma-associated fibroblasts decrease the susceptibility of melanoma tumor cells to Natural killer (NK) cell lysis through a mechanism dependent on the secretion of active matrix metalloproteinases (MMPs). This secretion of MMPs reduces the expression of the two NKG2D ligands, MICA/B at the surface of the tumor cells and consequently decreases the NKG2D-dependent cytotoxic activity of NK cells against melanoma tumor cells. On the other hand, using a global genomic approach, my results suggested that hypoxia within the tumor stroma could increase the immunomodulatory capacities of CAFs by modifying the expression of a set of genes that encode for immunosuppressive proteins. Together, our results show that CAFs are essential determinants modifying the susceptibility of tumor cells to killer cells but that there is also a crosstalk between the hypoxic microenvironment and the CAFs allowing them to increase their immunosuppressive potential.