



HAL
open science

Annexine A1 : dissémination et microenvironnement tumoral

Solène Delorme

► **To cite this version:**

Solène Delorme. Annexine A1 : dissémination et microenvironnement tumoral. Cancer. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2020. Français. NNT : 2020CLFAC042 . tel-03158576

HAL Id: tel-03158576

<https://theses.hal.science/tel-03158576>

Submitted on 4 Mar 2021

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

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

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biologie Santé

ANNEXINE A1 : DISSEMINATION ET MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

Soutenue le 15 décembre 2020

Par

Solène DELORME

Rapporteurs : Dr. Ingrid Masse, MCF HDR, CRCL, UMR5286, Lyon

Dr. Claude Boucheix, DR INSERM, U935, Villejuif

Dr. Lionel Larue, DR INSERM, UMR3347, Orsay

Membre du Jury : Dr. Pierre VAL, DR CNRS, UMR6293, Clermont-Ferrand

Directrice de thèse : Dr. Françoise Degoul, CR INSERM, UMR1240, Clermont-Ferrand

Co-encadrantes : Dr. Maud Privat, Chercheur CJP, UMR1240, Clermont-Ferrand

Dr. Mercedes Quintana, MCF, UMR1240, Clermont-Ferrand

À mon arrière-grand-père,

À Louise,

« Cela semble toujours impossible, jusqu'à ce qu'on le fasse »

Nelson Mandela

« La différence entre le possible et l'impossible se trouve dans la détermination »

Gandhi

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier les Docteurs Ingrid Masse, Claude Boucheix et Lionel Larue d'avoir accepté de lire ce travail de thèse. Merci pour le temps que vous aurez consacré à l'étude de ce manuscrit.

Je remercie également le Docteur Elisabeth Miot-Noirault, directrice de l'UMR 1240, pour son accueil au sein du laboratoire.

Je souhaite tout particulièrement remercier ma directrice de thèse, Françoise Degoul, qui a su suivre au plus près l'intégralité de ces travaux et me guider pendant ces trois années. Merci pour ton aide, tes conseils, ton soutien. Et surtout, merci de m'avoir fait confiance pour ce projet et d'avoir été disponible pendant ces trois ans. Je te souhaite une belle continuation dans tes nouveaux projets.

J'ai également eu l'opportunité d'avoir deux co-encadrantes pendant cette thèse.

Maud, je tiens à te remercier pour ton aide, notamment pour la rédaction des appels à projets mais également pour les expériences et les analyses lorsque c'était possible. Merci d'avoir été disponible pour répondre à mes questions et m'aider à mieux comprendre le monde des ARN. Je retiendrai également notre passage à Lyon pour le CRCL, merci de m'y avoir accompagnée et soutenue.

Mercedes, j'ai eu la chance de débiter cette thèse en partageant ton bureau. Merci pour ton accueil, et merci de m'avoir tout de suite prise sous ton aile. Tu as su être à l'écoute, me rassurer, me soutenir et m'encourager. Merci de m'avoir aidée dès que possible sur les expériences malgré ton emploi du temps bien chargé. J'espère que grâce à moi tu apprécies un peu plus les souris maintenant.

A toutes les deux un immense merci pour votre investissement et votre écoute. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

D'autres personnes ont également participé à ce projet, notamment Tiffany et Nicolas.

Tiffany, merci pour ton soutien, ton aide et pour la rédaction de la saisine qui n'a pas été une mince affaire. Également merci pour tes conseils avisés pour les expérimentations *in vivo*.

Nicolas, comment ne pas te remercier. Nous avons commencé à travailler tous les deux dès mon stage de master 2. Ça a été un plaisir de travailler et d'apprendre à tes côtés. Merci pour tes conseils et surtout ton aide précieuse sur les expériences. J'en retiens quelques-unes en particulier comme les CMF qui nous ont procuré à la fois beaucoup de rigolades mais aussi pas mal de déception. Et je suis bien évidemment obligée de parler de ces longues heures en compagnie des souris, les entraînements

aux i.v, les sessions d'injections, les passages à l'IVIS etc. Merci d'avoir été là, de m'avoir épaulée, toujours dans une bonne ambiance. Nous avons formé pendant ces trois années un binôme de choc. Je te souhaite une très belle continuation.

Merci également aux différents collaborateurs de ce projet. Merci au Professeur Fulvio D'Acquisto d'avoir pris part à ce projet et de nous avoir apporté son expertise, ses remarques et ses encouragements. Merci également au Docteur Gaëtan Juban de nous avoir généreusement fourni les souris *Anxa1* KO.

Je souhaite aussi remercier les stagiaires qui ont participé à ce projet de près ou de loin : Camille, Gwendoline, Clément et Erwan.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire qui ont participé au bon déroulement de cette thèse.

Un grand merci à Sophie qui m'a formée sur un grand nombre d'expérimentations et qui a toujours été à l'écoute et bienveillante. Merci d'avoir pris de ton temps pour répondre à mes nombreuses questions, me guider, me conseiller. Je retiendrai notamment nos nombreuses heures passées toutes les deux en culture cellulaire. Également merci pour ton soutien et tes encouragements.

Merci à Leslie (alias Monica) et Sébastien. J'ai eu la chance de partager avec vous des moments hors du laboratoire qui m'ont permis de décompresser et surtout de bien rigoler. Merci pour votre écoute, votre gentillesse et votre bonne humeur. Je ne sais toujours pas dire qui est mon partenaire de badminton préféré.

Qui de mieux pour comprendre un thésard qu'un thésard ! J'ai eu l'opportunité pendant ces trois années passées au laboratoire de rencontrer d'autres doctorants de divers horizons.

Jacques, merci pour tes nombreux conseils sur mes travaux, ton écoute, ta bonne humeur et ta disponibilité. Je tiens particulièrement à te remercier pour ton aide lors des manip de RT-qPCR et pour le temps que tu m'as consacré. Tu fais partie des belles rencontres que cette thèse m'a apportées.

Élise, comment ne pas te remercier. Merci d'avoir été là tout simplement. Tu as été pour moi un soutien indispensable pendant cette thèse. Tu as su me comprendre et m'épauler dans les moments compliqués. Il a été difficile pour moi de te voir partir du laboratoire à la fin de ta thèse mais tu as continué à me soutenir, à être là pour moi et je t'en remercie. Nous avons construit une belle amitié qui j'espère perdurera au-delà du laboratoire.

Roxane, je tiens à te remercier pour ta bonne humeur, ta spontanéité et ton écoute. Je me rappellerai de notre grand ré-aménagement du bureau, notre petite ambiance zen, le congrès à Lyon, et nos sorties DASRI pleine de rebondissements que je ne suis pas prête d'oublier ! Merci pour tous ces bons

moments partagés, je te souhaite une belle continuation et beaucoup de réussite pour cette fin de thèse.

Elodie, également un grand merci pour tes nombreux conseils que ce soit sur les expériences ou sur la rédaction : tu as su me guider et me rassurer quand je perdais un peu pied. Merci pour ta gentillesse et ton écoute. Je te souhaite plein de bonheur dans cette nouvelle vie qui t'attends.

Leslie, nous avons fait nos premiers pas au laboratoire en même temps, également au badminton dont on peut noter notre nette progression. Je te souhaite beaucoup de réussite pour cette fin de thèse et un bel avenir professionnel et personnel.

Merci également aux autres doctorants du laboratoire d'hier et d'aujourd'hui : Aurélie, Ludivine, Yvain, Mona, Axel, Noura, Mouhamed...

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse, Pierre Val et Jérôme Busserolles pour leurs précieux conseils et leur regard extérieur qui m'ont permis de focaliser mes recherches et de mieux appréhender cette dernière année. Un remerciement supplémentaire à Pierre Valle pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un grand merci aux personnes qui m'ont permis d'accéder aux plateformes et surtout de me former à de nouvelles techniques. Merci à Christelle Soubeyrand-Damon (Anipath), Christelle Blavignac (CICS) et Caroline Vachias (CLIC). Merci à toutes les trois pour votre disponibilité et votre bienveillance.

J'ai également eu la chance pendant deux années consécutives de retourner aux sources en effectuant des heures d'enseignement à l'IUT de Clermont-Ferrand où j'ai réalisé une partie de mes études. Pour cela, je souhaite remercier Mathilde Bonnet et Marie-Dominique Daguisy pour m'avoir permis de réaliser cette expérience très enrichissante. Merci à toutes les deux pour votre accompagnement. Également merci de m'avoir rassurée et épaulée pour mes premiers pas avec les étudiants.

Cette thèse n'aurait également pas été possible sans le soutien ma famille et de mes amis.

Merci particulièrement à mes parents qui m'ont soutenue pendant ces trois années de thèse. Papa, j'ai toujours été fière que tu sois docteur et maintenant je vais moi-même le devenir même si ce ne sera pas en chimie. Merci de m'avoir aidée dès que tu l'as pu pendant ces années d'études. Merci pour tes encouragements, ton soutien et surtout merci de m'avoir transmis ta rigueur et ton sens du travail. Maman, comment ne pas te remercier après toutes ces discussions à me remonter le moral, à m'encourager, à me redonner confiance, à m'apprendre à relativiser. Sans toi je n'aurais pas fait la moitié de ce que j'ai accompli que ce soit dans mes études ou dans ma vie personnelle.

Fanny, merci d'avoir toujours été à mes côtés pendant ces huit longues années d'études. Merci d'avoir su m'écouter, me soutenir, et me comprendre. Anthony et Mathilde, vous avez suivi de plus loin cette

thèse mais vous m'avez fait le plus beau cadeau du monde en janvier dernier. Ces petits moments passés avec Louise étaient les meilleures pauses qu'on puisse avoir.

Marion, un grand merci pour ton soutien. Pendant toutes ces années tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'épauler et je t'en suis énormément reconnaissante. J'ai hâte de pouvoir enfin venir te voir à Gannat !

Un énorme merci à tous mes amis, merci de m'avoir aidée à décompresser, de m'avoir redonné le sourire et de m'avoir soutenue et encouragée jusqu'au bout : Mélanie, Lucas, Thomas, Roxane, Manon, Sonia, Joris, Alex, Guillaume, Marie, Marina, Sophie.

Un grand merci supplémentaire à mes correcteurs d'orthographe : Alex et guillaume.

Maxime... et non je ne t'ai pas oublié même si tu aurais bien aimé. Je ne sais même pas par où commencer pour te remercier mais promis je vais faire court. Merci de m'avoir aidée à surmonter mes déceptions, mes doutes, mes angoisses, mes remises en question. Tu as su avoir les mots justes pour m'épauler et me remotiver, particulièrement dans cette dernière année qui a été semée d'embûches. Merci de m'avoir redonné le sourire quand je l'avais perdu, de m'avoir aidée à lâcher prise, à déconnecter. Merci d'avoir été au petit soin pour moi et j'espère bien te le rendre en janvier...

ENSEIGNEMENTS ET ENCADREMENT DE STAGIAIRE

Enseignements :

TP Caractérisation histologique et immunohistochimique d'une tumeur du côlon. Deuxième année de DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques, IUT, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand (février-mars 2019, 32 h et février-mars 2020, 50 h).

TP Étude d'un modèle syngénique de développement tumoral (mélanome) chez la souris : comparaison de la croissance tumorale en fonction du type d'injection. Licence professionnelle Bio-Industries et Biotechnologies, IUT, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand (février-mars 2019, 14 h et février-mars 2020, 14h).

Encadrement de stagiaire :

Gwendoline Constant : 1^{ère} année de Master Biologie Santé : Oncologie Moléculaire et Biothérapie, Université des Sciences et Techniques, Limoges, « Rôle de l'annexine A1 extracellulaire dans la capacité métastatique du mélanome et du cancer du sein triple négatif » (du 01/04/2019 au 24/05/2019).

COMMUNICATIONS ORALE ET AFFICHÉE

Communication orale :

23^{ème} Journée de l'École Doctorale des Sciences de la Vie Santé Agronomie Environnement (JED SVSAE), (14 et 15 octobre 2020) : « ANXA1, dissemination and tumor microenvironnement »

Prix de la meilleure communication remis par le Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA)

Communication affichée :

4^{ème} « international cancer symposium Cancer Research Center of Lyon (CRCL), (du 2 au 4 octobre 2019) : « Characterization of extracellular annexin A1 and its role in tumor growth and dissemination of melanoma ».

Solène Delorme, Maud Privat, Nicolas Sonnier, Gaëtan Juban, Aurélie Maisonia-Besset, Elisabeth Miot-Noirault, Fulvio D'Acquisto, Mercedes Quintana, Françoise Degoul

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

| | |
|---------------|--|
| AA | acide aminé |
| AAT | antigènes associé au tumeur |
| Ac2-26 | peptide mimant une partie du domaine Nter de l'ANXA1 |
| ADNc | acide desoxyribonucléique complémentaire |
| ANX | annexine |
| ANXA1 | annexine A1 |
| AR | « androgen receptor » |
| Arg-1 | arginase 1 |
| AST | antigène spécifique des tumeurs |
| ATCC | « american type culture collection » |
| ATF6 | « activating transcription factor 6 » |
| ATP | adénosine triphosphate |

B

| | |
|------------|---|
| Bad | « BCL2 associated agonist of cell death » |
| Bax | « BCL2 associated X » |
| Bak | « BCL2 antagonist killer » |

C

| | |
|------------|--------------------------------------|
| CAF | « cancer associated fibroblast » |
| CCL | « C-C motif chemokine ligand » |
| CD | cellule dendritique |
| Cf | confère |
| CMF | cytométrie en flux |
| CMH | complexe majeur d'histocompatibilité |
| CMV | corps multivésiculaires |

| | |
|--------------|---|
| COX | cyclooxygénase |
| CPAg | cellule présentatrice d'antigène |
| CRT | calréticuline |
| CS | cancer du sein |
| CSF-1 | « colony stimulating factor 1 » |
| CSTN | cancer du sein triple négatif |
| Ct | « cycle threshold » |
| Cter | carboxy-terminal |
| CTLA4 | « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » |

D

| | |
|-------------|--|
| DAMP | « damage associated molecular patterns » |
| DMBA | 7,12-dimethylbenz[a]anthracene |
| DPBS | « Dulbecco's phosphate-buffered saline » |

E

| | |
|--------------|---|
| EDTA | éthylènediaminetétraacétique |
| EGF | « epidermal growth factor » |
| EGFR | « epidermal growth factor receptor » |
| EGTA | « ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid » |
| eIF2a | « eukaryotic translation initiation factor 2A » |
| ERK | « extracellular signal-regulated kinases » |

F

| | |
|-------------|---|
| FGF | « fibroblast growth factor » |
| fMLP | N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-phenylalanine |
| FPR | « formyl peptide receptor » |

G

| | |
|---------------|---|
| GC | glucocorticoïde |
| G-MDSC | « granulocyte-like myeloid derived suppressor cells » |

H

| | |
|--------------|--|
| HER2 | « human epidermal growth factor receptor 2 » |
| HGF | « hepatocyte growth factor » |
| HIF | « hypoxia inducible factor » |
| HMGB1 | « high mobility group box 1 » |
| HRP | « horseradish peroxidase » |

I

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| ICAM-1 | « intercellular adhesion molecule 1 » |
| ICD | « immunologic cell death » |
| IFNβ/γ | interféron béta/gamma |
| IL | interleukine |
| INCa | institut national du cancer |
| IRE1 | « inositol requiring enzyme 1 » |

JK

| | |
|------------|-----------------------------|
| JNK | « c-Jun N-terminal kinase » |
| KO | « knock-out » |

L

| | |
|-------------|--|
| LB | lymphocytes B |
| LRP1 | « low density lipoprotein receptor-related protein 1 » |
| LT | lymphocytes T |
| Luc | luciférase |
| LXA4 | « lipoxin A1 » |
| Ly49 | « killer cell lectin-like receptor A1 » |

M

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| MAPK | « mitogen-activated protein kinases » |
|-------------|---------------------------------------|

| | |
|-----------------|--|
| MCL-1 | « induced myeloid leukemia cell differentiation protein » |
| M-CSF | « macrophage colony-stimulating factor » |
| MDMX | « murine double minute X » |
| MEC | matrice extracellulaire |
| MET | microenvironnement tumoral |
| METABRIC | « molecular taxonomy of breast cancer international consortium » |
| MFI | « mean fluorescence intensity » |
| MMP2/9 | métalloprotéase matricielle 2 et 9 |
| MTE | migration trans-endothéliale |

N

| | |
|--------------|---|
| NE | « neutrophil elastase » |
| NET | « neutrophil extracellular trap » |
| NK | « natural killer » |
| NKG2D | « killer cell lectin-like receptor K1 » |
| NKp46 | « natural killer cell p46-related protein » |
| NO | oxyde nitrique |
| Nter | amino-terminal |

P

| | |
|---------------|--|
| PARP | poly(ADP-Ribose) polymérase |
| PBMC | « peripheral blood mononuclear cells » |
| PCR | « polymerase chain reaction » |
| PD1 | « programmed cell death 1 » |
| PDGF | « platelet derived growth factor » |
| PDL1/2 | « programmed death-ligand 1/2 » |
| PERK | « PKR-like ER protein kinase » |
| PI3K | « phosphoinositide 3-kinase » |

| | |
|--------------|----------------------------------|
| PIGF | « placental growth factor » |
| PKB/C | protein kinase B/C |
| PL | phospholipide |
| PLA2c | phospholipase A2 cytosolique |
| PMN | polymorphonucléaire |
| PR3 | protéinase 3 |
| PRR | « pattern recognition receptor » |
| PS | phosphatidylserine |

QR

| | |
|------------|-----------------------------|
| QR | quantification relative |
| RE | réticulum endoplasmique |
| RO | récepteur aux œstrogène |
| ROS | « reactive oxygen species » |
| RP | récepteur à la progestérone |

S

| | |
|----------------|--|
| SDF-1 | « stromal cell-derived factor 1 » |
| siANXA1 | ARN interférent (« siRNA ») dirigé contre l'ANXA1 |
| siCTRL | ARN interférent (« siRNA ») contrôle |
| STAT3 | « signal transducer and activator of transcription 3 » |
| SVF | sérum de veau fœtal |

T

| | |
|-------------|----------------------------------|
| TAM | « tumor associated macrophages » |
| TAN | « tumor associated neutrophils » |
| tBoc | <i>tert</i> -butoxycarbonyle |
| TCGA | « the cancer genome atlas » |
| TCR | « T cells receptor » |

| | |
|-------------------------------|--|
| Teff | lymphocyte T effecteur |
| TEM | transition épithélio-mésenchymateuse |
| TGFβ | « transforming growth factor β » |
| Th | « T helper » |
| TLR | « toll like receptor » |
| TN | triple négatif/négative |
| TNFα | « tumor necrosis factor α » |
| Treg | lymphocyte T régulateur |
| Tspan8 | tétraspamine 8 |

UVW

| | |
|---------------|--|
| UPR | « unfolded protein response » |
| VCAM-1 | « vascular cell adhesion molecule 1 » |
| VEGF | « vascular-endothelial growth factor » |
| vs. | versus |
| WT | « wild type » |

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Arbre évolutif et classification de la superfamille des annexines (ANX).

Figure 2 : Organisation structurale des gènes codants les annexines humaines.

Figure 3 : Structure protéique de l'annexin A1.

Figure 4 : Séquence protéique de l'annexine A1.

Figure 5 : Conformation de l'annexine A1 en absence et en présence de calcium.

Figure 6 : Modélisation du changement conformationnel de l'annexine A1 en présence de calcium.

Figure 7 : Mécanismes d'agrégation membranaire de l'annexine A1.

Figure 8 : Implication de l'annexine A1 dans l'endocytose du récepteur à l'EGF (EGFR).

Figure 9 : Implication de l'annexine A1 dans la formation de la coupe phagocytaire.

Figure 10 : Acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative.

Figure 11 : Inhibition de la phospholipase A2 (PLA2) par l'annexine A1.

Figure 12 : Effet de l'annexine A1 sur la migration trans-endothéliale des neutrophiles.

Figure 13 : Effet de l'annexine A1 sur l'apoptose et l'efférocytose des neutrophiles.

Figure 14 : Effet de l'annexine A1 sur les monocytes/macrophages.

Figure 15 : Effet de l'annexine A1 sur l'activation et la différenciation des lymphocytes T.

Figure 16 : Modulation des différentes cellules du système immunitaire par l'annexine A1.

Figure 17 : Caractéristiques principales des cellules cancéreuses.

Figure 18 : L'annexine A1 module la progression tumorale dans différents types de cancer.

Figure 19 : Représentation schématique d'une coupe de sein.

Figure 20 : Classification histologique des cancers du sein (CS).

Figure 21 : Contrôle négatif des lymphocytes T par CTLA4 et PD1.

Figure 22 : Expression de l'annexine A1 dans le cancer du sein.

Figure 23 : Stimulation de la prolifération des cellules de cancer du sein par l'annexine A1.

Figure 24 : Principales modifications cellulaires de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

Figure 25 : Étapes de la croissance tumorale du mélanome.

Figure 26 : Les différents types de mélanome.

Figure 27 : Effet de l'annexine A1 sur l'invasion du mélanome.

Figure 28 : Les trois phases « E » de l'immunoédition.

Figure 29 : Les différents types d'antigènes tumoraux.

Figure 30 : Activité anti-tumorale des cellules NK.

Figure 31 : Mécanismes d'échappement des cellules tumorales aux cellules cytotoxiques.

Figure 32 : Inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale par les lymphocytes T CD4+ régulateurs (Treg).

Figure 33 : Neutrophiles circulants pro- et anti-tumoraux.

Figure 34 : Activité pro-tumorale des neutrophiles associés aux tumeurs (TAN).

Figure 35 : Polarisation des macrophages.

Figure 36 : Fonctions pro-tumorales des macrophages M2.

Figure 37 : Processus de formation des vaisseaux.

Figure 38 : Organisation des vaisseaux normaux et tumoraux.

Figure 39 : Régulation de l'angiogenèse par les cellules tumorales et immunitaires.

Figure 40 : Régulation des cellules immunitaires par l'hypoxie.

Figure 41 : Rôle des fibroblastes associés aux cancers (CAF) dans le microenvironnement tumoral.

Figure 42 : Libération de signaux de danger par les cellules tumorales suite à l'induction de la mort immunogénique.

Figure 43 : Implication de l'annexine A1 dans l'angiogenèse.

Figure 44 : Analyse de l'annexine A1 extracellulaire avec ou sans EGTA.

Figure 45 : Les différentes étapes de l'analyse de migration cellulaire *in vitro*.

Figure 46 : Expression de l'annexine A1 dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein et de mélanome.

Figure 47 : Sécrétion de l'annexine A1 par différentes lignées cellulaires de cancer du sein et de mélanome.

Figure 48 : Reconnaissance de l'annexine A1 recombinante humaine par le VJ4B6.

Figure 49 : L'anticorps bloquant VJ4B6 à 50 ng/mL n'influe pas sur la migration cellulaire.

Figure 50 : L'anticorps bloquant VJ4B6 à 20 µg/mL n'influe pas sur la migration cellulaire.

Figure 51 : Le blocage de l'annexine A1 avec le VJ4B6 n'influe pas sur le développement et la progression tumorale des cellules de mélanome murin B16Bl6.

Tableau 1 : Récapitulatif des principaux noms associés aux annexines des vertébrés.

Tableau 2 : Pourcentage d'identité en acides aminés des différents récepteurs FPR humains (FPR) et murins (Fpr).

Tableau 3 : Liste non exhaustive des ligands des récepteurs FPR1 et FPR2.

Tableau 4 : Les différents sous-types moléculaires de cancer du sein définis par Perou, Sorlie et leurs collaborateurs.

Tableau 5 : Conditions de culture des différentes lignées cellulaires de cancer du sein et de mélanome utilisées dans cette étude.

Tableau 6 : Analyse de l'annexine A1 totale et membranaire par cytométrie en flux.

Tableau 7 : Reconnaissance de l'annexine A1 totale et membranaire par le VJ4B6 en cytométrie en flux.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Tableau récapitulatif de l'expression de l'ANXA1 dans différents cancers et son implication dans le développement et la progression tumorale.

Annexe 2 : Évaluation des capacités de reconnaissance du VJ4B6 par cytométrie en flux au niveau de cellules immunitaires humaines et murines.

Annexe 3 : Inhibition de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T murins par le VJ4B6.

Annexe 4 : Publication parue dans journal « cancer immunology immunotherapy », le 23 mai 2020, « Immune checkpoint inhibitors reverse tolerogenic mechanisms induced by melanoma targeted radionuclide therapy », PMID : 32447411

RÉSUMÉ

L'annexine A1 (ANXA1) appartient à la vaste superfamille des annexines qui englobe des protéines capables de se lier aux phospholipides membranaires de façon calcium dépendante. C'est une protéine multifonctionnelle initialement décrite pour ses propriétés anti-inflammatoires. Elle est présente dans le noyau, le cytosol et les membranes cellulaires et peut également être sécrétée et clivée dans le milieu environnant. L'ANXA1 présente un important intérêt en oncologie du fait de sa dérégulation dans de nombreux cancers. En fonction des types de cancers, l'ANXA1 est surexprimée ou sous-exprimée par rapport au tissu sain. Elle est surexprimée dans le cancer du sein triple négatif par rapport aux autres sous-types de tumeurs mammaires et dans les mélanomes par rapport aux mélanocytes. Dans ces deux pathologies, bien que l'ANXA1 soit associée aux processus de prolifération, migration et invasion, les mécanismes précis de son rôle au sein d'une tumeur restent mal connus, notamment ceux impliquant la fraction extracellulaire. Les études menées sur des souris n'exprimant pas l'*Anxa1* ont également montré que l'ANXA1 stromale est impliquée dans le développement et la progression tumorale.

Le premier objectif a donc été de tester la possibilité de bloquer la protéine extracellulaire via un anticorps monoclonal breveté, le VJ4B6, pour diminuer la migration (*in vitro*) et la dissémination (*in vivo*). Nos données montrent que le VJ4B6 ne permet pas de limiter la migration cellulaire des lignées de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231-luc) et de mélanome (SK-MEL-28 et A375-MA2) présentant de l'ANXA1 extracellulaire. Cet anticorps ne permet pas non plus de limiter le développement et la dissémination tumorale du mélanome B16Bl6 *in vivo*.

Le second objectif a été d'étudier le rôle de l'ANXA1 tumorale et stromale dans le développement et la dissémination du mélanome. Nos résultats ont montré que l'ANXA1 tumorale est impliquée dans la prolifération des cellules A375-MA2 et SK-MEL-28 *in vitro*. L'utilisation de souris invalidées pour l'*Anxa1* a également permis de mettre en évidence que l'ANXA1 stromale favorise le développement tumoral et la formation de métastases des cellules murines B16Bl6 *in vivo*. De façon intéressante, les études réalisées sur les tumeurs ont montré que l'absence d'ANXA1 stromale limite la prolifération des cellules tumorales ainsi que l'angiogenèse. Ceci peut donc expliquer la progression limitée des tumeurs chez les souris invalidées. De plus, les tumeurs développées chez ces dernières présentent une surexpression des marqueurs lymphocytaires (CD3, CD4, FoxP3, CD8a, NKp46) par rapport à celles développées chez les souris sauvages. Cet afflux lymphocytaire concerne à la fois les lymphocytes pro- et anti-tumoraux. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce dernier soit une conséquence d'une perméabilité accrue des vaisseaux tumoraux au niveau des tumeurs des souris invalidées pour l'*Anxa1*.

Mots clés: annexine A1 extracellulaire, cancer du sein triple négatif, mélanome, progression tumorale, microenvironnement, immunité, angiogenèse.

ABSTRACT

Annexin A1 (ANXA1) belongs to the annexin superfamily, which includes proteins capable of binding membrane phospholipids in a calcium dependent manner. This is a multifunctional protein initially described for its anti-inflammatory properties. ANXA1 can be nuclear, cytosolic, membrane and it can also be secreted and cleaved in surrounding environment. It presents a real interest in oncology due to its deregulation in many cancers. Depending on cancer types, ANXA1 is up- or down-regulated compared to normal tissues. It is overexpressed in triple negative breast cancer relative to other subtypes of breast tumors and in melanoma compared to melanocytes. In both pathologies, ANXA1 is associated with proliferation, migration and invasion processes, but the exact mechanism of its roles in tumors still unknown, especially those mediated by extracellular fraction. Studies carried out with *Anxa1* null mice have shown the ANXA1 from stromal cells implication in tumor development and progression.

The first objective of this work was to test the opportunity to block extracellular ANXA1 with a monoclonal patented antibody, VJ4B6, to decrease migration (*in vitro*) and dissemination (*in vivo*). Our results showed that VJ4B6 was unable to limit cellular migration of triple negative breast cancer (MDA-MB-231-luc) and melanoma (SK-MEL-28 and A375-MA2) cell lines presenting extracellular ANXA1. This antibody was also unable to decrease tumor development and dissemination of B16Bl6 melanoma *in vivo*.

The second objective was to study the role of ANXA1 from tumoral and stromal cells in melanoma development and dissemination. Our results highlighted involvement of tumoral ANXA1 in proliferation of A375-MA2 and SK-MEL-28 melanoma cells *in vitro*. The use of *Anxa1* null mice allowed to reveal that stromal ANXA1 promotes tumor development and metastases formation of murine B16Bl6 cells *in vivo*. Interestingly, studies of tumors showed that stromal ANXA1 absence limits both proliferation of tumor cells and angiogenesis. This could explain the decreased progression of tumors in *Anxa1* null mice. Furthermore, tumors developed in these mice presented overexpression of lymphocyte markers (CD3, CD4, FoxP3, CD8a, NKp46) compared to those developed in wild-type mice. This lymphocyte influx concerned both pro- and anti-tumoral lymphocytes. Our hypothesis is that lymphocyte influx is a result of increased tumor vessels permeability in tumors from *Anxa1* null mice.

Key words: extracellular annexin A1, triple negative breast cancer, melanoma, tumor progression, microenvironment, immunity, angiogenesis.

ÉTHIQUE ANIMALE

Au cours de ce travail de thèse plusieurs études *in vivo* ont été réalisées, nécessitant de l'expérimentation animale. Ces travaux ont fait l'objet d'une demande d'autorisation de projet et ont été validés par le comité d'éthique local (C2E2A, Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Auvergne) et par le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement et de la recherche (autorisation n°17844). Durant toutes ces études le bien-être animal a été respecté.

Une observation journalière des animaux a été assurée afin de vérifier le comportement général des souris. Une observation trihebdomadaire plus poussée a également été réalisée afin de suivre le volume tumoral et le poids de chaque souris et de vérifier qu'aucun point limite n'était atteint (perte de poids > 20%, tumeur > 10% poids animaux). Les animaux ont été hébergés par groupe de 6 maximum dans des cages ventilées de 435cm² contenant de l'enrichissement de milieu (cabane, coton, bois) afin de favoriser leur comportement naturel et de limiter leur anxiété. La pièce d'hébergement des animaux est thermostatée à 24°C afin de respecter les normes d'ambiances optimales pour l'espèce avec un cycle de lumière 12h/12h. Les litières et les cages ont été entièrement changées une fois par semaine, le plus souvent à la suite d'une procédure.

Des précautions ont été prises lors de l'utilisation de souris mâles et femelles. Afin d'éviter les signes d'agressivité chez les mâles, ces derniers ont été systématiquement manipulés avant les femelles et les gants ont été changés entre chaque cage. Les souris mâles présentant des signes d'agressivité ont été isolées afin de ne pas blesser leurs congénères et hébergées dans des cages avec de l'enrichissement (maison, tuyau, morceaux de bois et de coton).

La mise à mort des animaux a été réalisée à la fin du protocole d'étude ou lorsque les points limites ont été atteints. Elle a été réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse (isoflurane).

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----------|
| REMERCIEMENTS..... | |
| ENSEIGNEMENTS ET ENCADREMENT DE STAGIAIRE..... | |
| COMMUNICATIONS ORALE ET AFFICHÉE | |
| LISTE DES ABBREVIATIONS | |
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX..... | |
| LISTE DES ANNEXES | |
| RÉSUMÉ..... | |
| ABSTRACT | |
| ÉTHIQUE ANIMALE | |
| TABLE DES MATIERES | |
| AVANT PROPOS | 1 |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE..... | 3 |
| PARTIE 1 : L'ANNEXINE A1, UNE PROTEINE MULTIFONCTIONNELLE IMPLIQUEE DANS DES PROCESSUS PHYSIOPATHOLOGIQUES VARIÉS | 4 |
| 1- La super-famille des annexines (ANX)..... | 4 |
| 1.1- Classification et nomenclature..... | 4 |
| 1.2- Les annexines de la famille A | 5 |
| 1.2.1- Distribution et expression tissulaire..... | 5 |
| 1.2.2- Homologie génique et structurale | 5 |
| 1.2.3- Liaison au calcium et aux phospholipides : fonction majeure | 6 |
| 2- L'annexine A1 des vertébrés : ANXA1 | 7 |
| 2.1- Expression tissulaire et composition génique..... | 7 |
| 2.2- Structure moléculaire de la protéine | 8 |
| 2.2.1- Domaine carboxy-terminal : cœur protéique | 9 |
| 2.2.2- Domaine amino-terminal : domaine régulateur | 10 |
| 2.2.3- Changement conformationnel de l'ANXA1 en présence de calcium | 11 |
| 3- Diversité fonctionnelle de l'ANXA1 | 12 |
| 3.1- Régulation du trafic membranaire | 12 |
| 3.1.1- ANXA1 et agrégation membranaire | 12 |

| | |
|---|----|
| 3.1.2- ANXA1 et trafic vésiculaire | 13 |
| 3.2- Régulation de la réponse immunitaire..... | 15 |
| 3.2.1- Inhibition de la phospholipase A2 (PLA2) médiateur pro-inflammatoire | 16 |
| 3.2.2- Régulation des neutrophiles | 17 |
| 3.2.2.1- Régulation de la migration trans-endothéliale (MTE)..... | 17 |
| 3.2.2.2- Régulation de l'apoptose et de l'efférocytose | 21 |
| 3.2.3- Régulation des monocytes/macrophages..... | 22 |
| 3.2.4- Régulation des autres cellules phagocytaires | 24 |
| 3.2.5- Régulation des lymphocytes (immunité adaptative) | 25 |
| PARTIE 2 : ROLES DE L'ANNEXINE A1 DANS LA PROGRESSION TUMORALE..... | 27 |
| 1- Dérégulation de l'ANXA1 dans les cancers..... | 27 |
| 1.1- Surexpression de l'ANXA1 | 27 |
| 1.2- Sous-expression de l'ANXA1 | 29 |
| 2- Expression controversée de l'ANXA1 dans le cancer du sein | 31 |
| 2.1- Épidémiologie du cancer du sein et classifications | 31 |
| 2.2- Le cancer du sein triple négatif (CSTN) | 32 |
| 2.3- Dérégulation de l'expression de l'ANXA1 dans les cancers du sein..... | 33 |
| 2.4- Rôle de l'ANXA1 dans le développement et la progression du cancer du sein | 35 |
| 2.4.1- Modulation de la prolifération cellulaire | 35 |
| 2.4.2- Modulation de la migration et de l'invasion | 37 |
| 2.4.3- Modulation de la transition épithélio-mésenchymateuse..... | 38 |
| 3- Dérégulation de l'ANXA1 dans le mélanome | 40 |
| 3.1- Épidémiologie et développement du mélanome..... | 40 |
| 3.2- Les traitements du mélanome | 41 |
| 3.3- Implication de l'ANXA1 dans l'agressivité du mélanome..... | 42 |
| PARTIE 3 : IMPLICATION DE L'ANNEXINE A1 DANS LA MODULATION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL | 45 |
| 1- Principales composantes du microenvironnement tumoral..... | 45 |
| 1.1- Le système immunitaire tumoral : concept de l'immunoédition | 45 |
| 1.1.1- Les cellules lymphocytaires..... | 47 |
| 1.1.1.1- Les lymphocytes effecteurs : anti-tumoraux..... | 47 |
| 1.1.1.2- Les lymphocytes régulateurs : pro-tumoraux | 48 |
| 1.1.2- Les neutrophiles | 49 |
| 1.1.3- Les monocytes/macrophages | 51 |
| 1.1.4- Les cellules dendritiques (CD) | 52 |
| 1.2- L'angiogenèse et l'hypoxie tumorale | 53 |

| | |
|--|----|
| 1.2.1- Le processus d'angiogenèse | 53 |
| 1.2.1.1- L'angiogenèse physiologique | 53 |
| 1.2.1.2- L'angiogenèse tumorale | 54 |
| 1.2.2- Influence de l'hypoxie tumorale sur les cellules immunitaires..... | 55 |
| 1.3- Autres composants du microenvironnement tumoral | 56 |
| 1.3.1- Les fibroblastes associés au cancer (CAF) | 56 |
| 1.3.2- La matrice extracellulaire (MEC) | 57 |
| 2- ANXA1 et microenvironnement tumoral | 58 |
| 2.1- ANXA1 et microenvironnement immunitaire | 58 |
| 2.1.1- Rôle stimulateur de l'ANXA1 sur les cellules immunitaires pro-tumorales | 59 |
| 2.1.2- Rôle stimulateur de l'ANXA1 sur la mort immunogénique | 60 |
| 2.2- ANXA1 et vascularisation tumorale | 62 |
| OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE | 64 |

TRAVAIL EXPERIMENTAL..... 65

PARTIE 1 : ÉTUDE DU ROLE DE L'ANXA1 EXTRACELLULAIRE DANS L'AGRESSIVITÉ TUMORALE ... 66

| | |
|--|----|
| 1- Contexte et objectifs | 66 |
| 2- Matériels et méthodes..... | 68 |
| 2.1- Cellules et réactifs | 68 |
| 2.2- Analyse de l'expression de l'ANXA1 par RT-qPCR..... | 68 |
| 2.3- Lyse des cellules et collecte des surnageants de culture | 69 |
| 2.4- Analyse du niveau protéique de l'ANXA1 par western blot..... | 70 |
| 2.5- Analyse de l'ANXA1 totale et membranaire par cytométrie en flux (CMF) | 70 |
| 2.6- Contrôle de la reconnaissance de l'ANXA1 par le VJ4B6 par dot blot | 71 |
| 2.7- Analyse des capacités migratoires des cellules tumorales | 71 |
| 2.8- Analyse de l'action du VJ4B6 <i>in vivo</i> | 71 |
| 3- Résultats..... | 72 |
| 3.1- Caractérisation de l'expression et de la localisation de l'ANXA1..... | 72 |
| 3.1.1- Expression de l'ANXA1 dans différentes lignées cellulaires..... | 72 |
| 3.1.2- Mise en évidence de l'ANXA1 extracellulaire (membranaire et sécrétée) | 73 |
| 3.2- Blocage de l'ANXA1 extracellulaire par un anticorps spécifique : effet sur la migration <i>in vitro</i> | 74 |
| 3.2.1- Validation du VJ4B6 pour les lignées de cancer du sein triple négatif et de mélanome..... | 75 |
| 3.2.2- Absence d'efficacité du VJ4B6 sur la migration <i>in vitro</i> | 76 |
| 3.3- Absence d'efficacité du VJ4B6 sur la croissance tumorale | 77 |

| | |
|---|------------|
| 4- Discussion | 77 |
| 5- Conclusions et perspectives | 82 |
| PARTIE 2 : ÉTUDE DU ROLE DE L'ANNEXINE A1 TUMORALE ET STROMALE DANS LA PROGRESSION DU MÉLANOME | 84 |
| 1- Présentation de l'article | 84 |
| 1.1- Contexte et objectif..... | 84 |
| 1.2- Principaux résultats..... | 85 |
| 1.3- Discussion..... | 86 |
| 1.4- Conclusion | 87 |
| 2- Article prochainement soumis | 88 |
| | |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 111 |
| | |
| <i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> | |
| <i>ANNEXES.....</i> | |
| <i>RÉSUMÉ.....</i> | |

AVANT PROPOS

Le cancer est une pathologie très meurtrière et hétérogène responsable de près de 157 000 décès en France en 2018 selon l'institut national du cancer ou INCa [1]. L'un des défis actuels est donc de développer des traitements personnalisés qui permettront d'augmenter le nombre de patients répondeurs et ainsi de limiter les phénomènes de résistance. Face à ce besoin grandissant de « mieux traiter » les patients atteints de cancer, une grande partie de la recherche en oncologie vise à identifier de nouvelles cibles non seulement thérapeutiques mais également pronostiques et diagnostiques. En effet, un diagnostic précoce permet d'augmenter considérablement les chances de survie des patients, et les cancers diagnostiqués à des stades métastatiques présentent des pronostics très péjoratifs. L'étude des mécanismes/protéines de dissémination tumorale est également priorisée au vu de la grande difficulté à traiter les cancers atteignant ces stades avancés. Les métastases sont en effet responsables de plus de 90% des décès par cancers (source INCa).

L'UMR 1240 IMoST INSERM/UCA (Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Clermont Auvergne) s'inscrit dans cette problématique en ayant pour principal objectif la mise à jour de nouveaux outils et/ou cibles pour le traitement et le suivi thérapeutique, principalement en oncologie. Cette unité bénéficie, de l'expertise de radiopharmaciens, anatomo-pathologistes, cliniciens, médecins nucléaires et oncologues du centre régional de lutte contre le cancer Jean Perrin et du CHU Gabriel Montpied. Elle possède différentes thématiques de recherche sur divers types de cancers dont le mélanome et le cancer du sein triple négatif. L'unité s'intéresse depuis plusieurs années à l'annexine A1, notamment son rôle dans l'agressivité du mélanome *in vitro* et *in vivo*.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse qui a bénéficié d'un financement par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR). Ce manuscrit se divise en trois parties :

- **Une introduction bibliographique**, permettant d'établir un état de l'art sur l'annexine A1, divisée en trois parties :
 - la première se consacre à replacer l'annexine A1 au sein de sa superfamille et également à la description de sa structure caractéristique et de ses principales fonctions.

- la seconde relate l'implication de l'annexine A1 dans la progression tumorale avec dans un premier temps une vue globale du rôle de cette protéine dans les cancers, puis se focalise sur les deux pathologies étudiées lors de ces travaux de thèse : le mélanome et le cancer du sein triple négatif.

- la troisième expose l'implication de l'annexine A1 dans la modulation du microenvironnement tumoral après avoir décrit ses principales composantes.

- **Une partie expérimentale**, permettant de présenter les principaux résultats obtenus, divisée en deux parties correspondant aux deux objectifs généraux de ces travaux. La seconde partie sera présentée sous forme d'article scientifique avec une présentation en français des principales données et conclusions.

- **Une partie conclusions et perspectives**, permettant de faire un bilan général de l'ensemble de ces travaux et de discuter des limites et des perspectives de cette étude.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

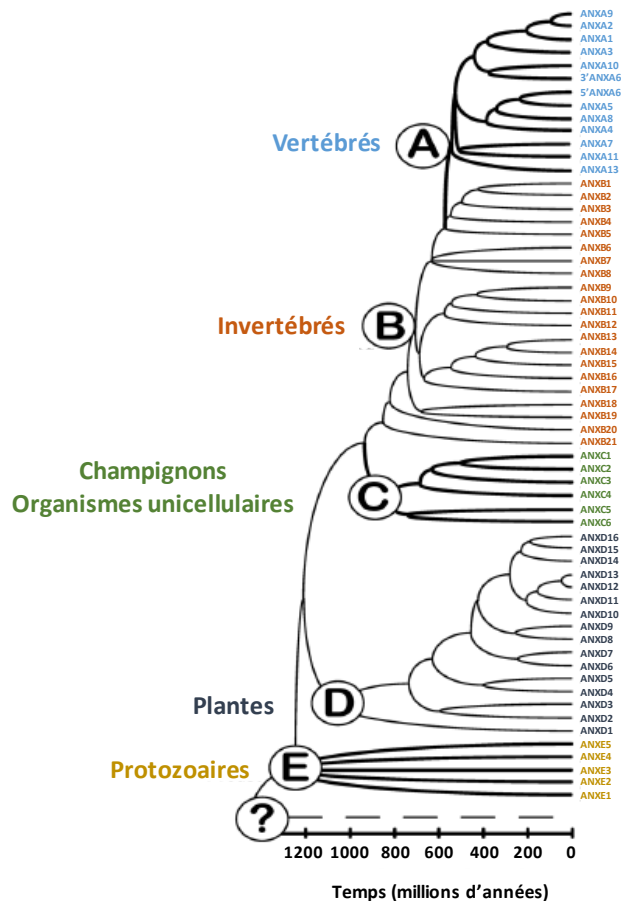


Figure 1 : Arbre évolutif et classification de la superfamille des annexines (ANX). Une analyse phylogénétique a été utilisée pour reconstruire les relations cladistiques et les distances évolutives entre les différentes ANX. Cinq grandes familles ont été identifiées en se basant sur l'appartenance des ANX aux vertébrés (A), aux invertébrés (B), aux champignons et êtres unicellulaires (C), aux plantes (D) et aux protozoaires (E). Les points de branchement entre les sous-familles correspondent à la présence de duplications géniques au cours du temps.

Adapté de Fernandez & Morgan, 2003 [4]

Tableau 1 : Récapitulatif des principaux noms associés aux annexines des vertébrés.

| Noms associés aux différentes annexines des vertébrés (famille A) | |
|---|--|
| A1 | Lipocortine I, P5, Calpactine II, Lipomoduline, Protéine inhibitrice PLA2, macrocortine, renocortine |
| A2 | Lipocortine II, P36, Calpactine I |
| A3 | Lipocortine III, PAP-III, Calcimedine 35- α |
| A4 | Lipocortine IV, Endonexine I, p28, Calcimedine 35- β |
| A5 | Lipocortine V, Endonexine II, inhibiteur de la Thromboplastine |
| A6 | Lipocortine VI, P68, P70, Calelectrine, Calphobindine-II |
| A7 | Synexine |
| A8 | Anti-coagulant vasculaire β |
| A9 | Pemphaxine |
| A10 | - |
| A11 | CAP-50, ALS23 |
| A13 | Annexine spécifique de l'intestin, ISA |

PARTIE 1 : L'ANNEXINE A1, UNE PROTEINE MULTIFONCTIONNELLE IMPLIQUEE DANS DES PROCESSUS PHYSIOPATHOLOGIQUES VARIÉS

1- La super-famille des annexines (ANX)

1.1- Classification et nomenclature

Selon le dictionnaire de l'académie nationale de pharmacie (AcadPharm), l'étymologie du terme annexine vient du latin « *adnexūs* » qui signifie « rattachement », suivi du suffixe –ine associé aux protéines. Le nom générique annexine a fait son apparition à la fin des années 1980 [2], une dizaine d'années après la découverte de la première annexine : la synexine, plus connue aujourd'hui sous le nom d'annexine A7 [3]. Il fait référence à la capacité des protéines de cette superfamille à se lier avec une forte affinité aux phospholipides (PL) membranaires, suivant un mécanisme dépendant du calcium (Ca^{2+}) dans la grande majorité des cas [2].

En 2003, plus de 500 annexines ont été recensées dans 125 espèces eucaryotes plus ou moins évoluées [4]. A ce jour, plus d'un millier d'annexines ont été découvertes chez les Eucaryotes [5]. La superfamille s'organise en 5 groupes/familles correspondant aux protéines identifiées chez les vertébrés (groupe A), les invertébrés (groupe B), les champignons et organismes unicellulaires (groupe C), les plantes (groupe D) et les protozoaires (groupe E) (**Figure 1**) [4], [6]. Ces familles se composent elles-mêmes de plusieurs membres/sous-familles allant de deux chez la fougère à vingt et un chez le zebrafish [6]. En regard de cette classification, la convention d'écriture pour les annexines est la suivante : le symbole « ANX » suivi de la lettre de la famille puis du chiffre arabe de la sous-famille. Par exemple, les douze annexines des mammifères sont désignées par les symboles suivants : ANXA1 à ANXA11 et ANXA13 [4]. Ces protéines ont été identifiées par plusieurs équipes et ont ainsi été nommées différemment sur la base de leur origine tissulaire et de leurs fonctions présumées (**Tableau 1**).

L'expression large des protéines de la superfamille des annexines au sein des Eucaryotes, qui s'étend des êtres unicellulaires à l'homme qui possède plus de 30 000 milliards de cellules, a soulevé la question de l'évolution de ces protéines. Des analyses phylogénétiques ainsi que des études de

génomiques comparatives se sont concentrées à identifier d'éventuelles annexines ancestrales et des liens d'évolution entre ces protéines. A l'heure actuelle, l'hypothèse la plus probable est l'apparition des différentes annexines suite à une série de duplications géniques. L'existence d'une annexine ancestrale reste quant à elle hypothétique malgré la présence de ces protéines chez les Eucaryotes inférieurs (**Figure 1**) [7], [8]. Cette vaste expression des annexines au sein des Eucaryotes plus ou moins évolués révèle également une importance fonctionnelle variée très probable de ces protéines. Les études menées sur des souris invalidées pour différents types d'annexines de la famille A ont mis en évidence leur implication dans différents processus comme l'inflammation, la coagulation ou encore les événements membranaires [9].

1.2- Les annexines de la famille A

1.2.1- Distribution et expression tissulaire

Les annexines comptent pour environ 2 à 4% des protéines cellulaires totales [10]. Elles sont majoritairement cytosoliques soit sous forme soluble soit associées à d'autres protéines (ex : protéines du cytosquelette) [6]. Dans une moindre mesure, certaines annexines (ex : ANXA11 et ANXA2) peuvent être retrouvées au niveau nucléaire et d'autres telles que l'ANXA1 à la surface des cellules. La grande majorité des annexines présente une distribution tissulaire très vaste (ANXA1/A3/A9) voire ubiquitaire (ANXA2/A4/A5/A6/A7/A11). Pour certaines telles que l'ANXA8, ANXA10 et ANXA13, leur expression est respectivement limitée au niveau de la peau, de l'estomac et du tractus gastro-intestinal [11]. L'ANXA1 et l'ANXA2 présentent une expression globale plus importante que les autres annexines, particulièrement l'ANXA2. A l'inverse, les annexines A9, A10 et A13 sont très peu exprimées. Pour les deux dernières, ceci peut s'expliquer en partie par leur spécificité tissulaire. Globalement, il existe donc une disparité de distribution tissulaire et d'expression entre les annexines allant d'ubiquitaire et fortement exprimée (ANXA2) à sélective et peu exprimée (ANXA10 et ANXA13).

1.2.2- Homologie génique et structurale

Les gènes codant les ANX des vertébrés sont répartis dans le génome au niveau de différents chromosomes. Ils sont par exemple dispersés sur huit chromosomes chez l'homme (chromosomes 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 et 15) et neuf chez la souris (chromosomes 3, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 19). On peut

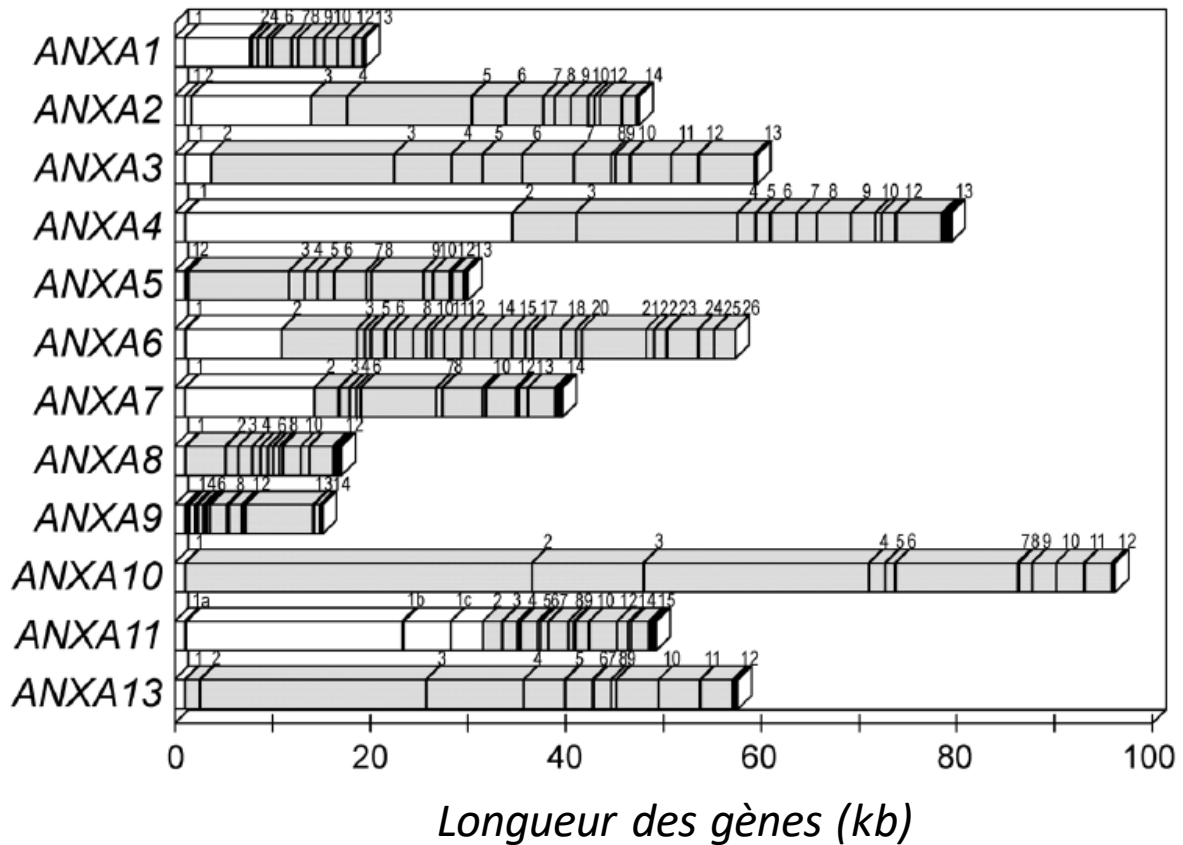


Figure 2 : Organisation structurale des gènes codant les annexines humaines. Les douze gènes codant les annexines humaines (famille A) présentent une organisation générale commune avec de nombreux introns dans la région 3' et des exons plus grands dans la région 5' (à l'exception de l'ANXA9). Le nombre d'exons ainsi que la longueur totale des gènes sont variables. Les introns sont représentés par les boîtes noires et les numéros des exons sont indiqués au-dessus des gènes.

Adapté de Fernandez & Morgan, 2003 [4]

également noter que leur expression est majoritairement plus importante chez l'homme que chez la souris. Cependant, les variations d'expression entre les ANXA restent similaires (à l'exception de l'ANXA11) [4]. De façon générale, ces gènes présentent une organisation assez similaire avec notamment des exons plus rapprochés dans la région 3', associés à la présence plus importante d'introns. Il existe par contre des disparités en termes de nombres d'exons et de taille des gènes. Les gènes codants les ANXA humaines possèdent par exemple des tailles variables allant de 14 kb pour l'ANXA9 à 96,3 kb pour l'ANXA10 [4] (**Figure 2**).

Malgré ces différences sur le plan génique, les ANXA des mammifères présentent 40 à 60% d'identité au niveau de leur séquence protéique (acides aminés, AA). De plus, pour une annexe donnée, la différence inter-espèces est assez faible. Par exemple, l'ANXA2 présente une homologie protéique de 98% entre sa forme humaine, bovine et murine [12]. Par contre entre espèces plus éloignées telles que les protozoaires (famille E) et les vertébrés (famille A), l'homologie protéique est inférieure à 30% [4]. Au regard de cette identité, toutes les annexines possèdent la même structure tridimensionnelle composée d'un domaine « cœur » très conservé et d'un domaine régulateur plus variable correspondant à la partie amino-terminale (Nter). Cette structure sera détaillée dans le paragraphe 2.2 de cette première partie avec notamment l'exemple de l'ANXA1. Elle est en lien direct avec la caractéristique commune majeure des ANX : la liaison aux PL et au calcium.

1.2.3- Liaison au calcium et aux phospholipides : fonction majeure

Les ANX présentent plus d'affinité pour les PL chargés négativement que pour le calcium. En effet, les constantes de dissociation sont plus importantes pour le calcium que pour les PL. De plus, les annexines possèdent une affinité variable en fonction des types de PL, avec une affinité importante pour les acides phosphatidiques, plus faible pour les phosphatidylsérines (PS) et encore plus faible pour les phosphatidylinositols. De façon intéressante, l'affinité des ANX pour le calcium est multipliée par cent en présence de PL [12], [13].

De par leur structure et leur localisation, les ANX possèdent de nombreuses autres fonctions avérées ou supposées en lien ou non avec leur liaison membranaire. On peut par exemple citer le rôle supposé de ces protéines en tant que constituant de canal ionique ou encore leur rôle démontré dans le trafic membranaire, l'inflammation ou encore la coagulation [12], [14]. Cette dernière fonction a notamment donné lieu à la définition par Jacob H. Rand en 2000 du terme « annexinopathies ». En effet, la dérégulation de l'ANXA2 et l'ANXA5 est associée à des pathologies avec atteintes vasculaires

dues à des défauts de coagulation (fibrinolyse excessive, thromboembolie), comme la leucémie promyélocytaire et le syndrome des anti-phospholipides respectivement [15].

L'aspect multifonctionnel des ANX ainsi que leur implication dans des processus physiopathologiques a suscité un intérêt grandissant pour la recherche sur cette superfamille. Un projet européen (BIO4CT960083) a d'ailleurs été engagé sur la période 1996-1999 afin de mieux comprendre et d'élucider la structure et les fonctions des ANX. Ce projet a donné lieu à la création d'un site internet qui répertorie un certain nombre de données ayant servi de base pour de nombreuses études, notamment des données de nomenclature, de séquences géniques et protéiques et de cristallographie (<http://www.structuralchemistry.org/annexins/index.php>).

Parmi les annexines les plus étudiées, on retrouve l'ANXA1 qui est la deuxième plus exprimée chez l'homme [4]. L'étude de cette protéine s'est d'abord focalisée sur son activité membranaire et anti-inflammatoire mais s'est ensuite élargi à de nombreuses autres fonctions impliquées notamment dans la carcinogenèse et la progression tumorale (prolifération, migration, invasion entre autres).

2- L'annexine A1 des vertébrés : ANXA1

L'ANXA1 également nommée macrocortine, rénocortine ou encore lipomoduline est l'une des premières annexines découverte et caractérisée au début des années 1980 [16]. Elle a initialement été décrite pour ses propriétés anti-inflammatoires associées à l'inhibition de la phospholipase A2 (PLA2). A l'heure actuelle, de nombreuses autres fonctions lui sont attribuées, liées ou non à l'immunité. Au fil des années et des connaissances, l'intérêt pour cette protéine multifonctionnelle n'a cessé d'augmenter notamment au vu de son potentiel rôle diagnostique et thérapeutique dans différentes pathologies humaines telles que les maladies inflammatoires ou encore les cancers.

2.1- Expression tissulaire et composition génique

L'ANXA1 est présente dans de nombreux tissus. Elle est fortement exprimée dans les poumons, la moelle osseuse, les tissus lymphoïdes, sexuels et le tractus digestif [11], [16]. A l'échelle cellulaire, l'ANXA1 est principalement localisée au niveau du cytosol et de la membrane plasmique [11]. Dans certains types cellulaires et sous certaines conditions (ex : modifications post-traductionnelles, activation, différenciation...), l'ANXA1 peut également être retrouvée au niveau nucléaire ou encore

sécrétée dans le milieu environnant. En effet, l'ANXA1 contient des séquences et motifs structuraux de liaison à l'ADN et/ou à l'ARN, et possède une activité hélicase qui pourrait intervenir dans les phénomènes de réplication et de réparation de l'ADN. La localisation nucléaire de l'ANXA1 est observée dans certains cancers comme le cancer de l'œsophage, et est associée à un mauvais pronostic [17]. La sécrétion de l'ANXA1 quant à elle, a été décrite dans l'inflammation (cf partie 1, paragraphe 3.2) et dans certains types de cancers (cf partie 2). On note également un très haut niveau d'ANXA1 détectable dans le liquide séminal (150 µg/mL) [16].

Le gène de l'ANXA1 est localisé au niveau du chromosome humain numéro 9 (localisation 9q21.13) et du chromosome 19 chez la souris. Il est constitué de 12 introns et 13 exons (**Figure 2**). Ce gène se compose de 18,7 kb qui codent pour 346 AA donnant naissance à une protéine de 37-38 kDa. L'alignement des séquences protéiques de l'ANXA1 humaine et murine grâce à l'outil en ligne « Ensembl » montre une identité de 87% sur la longueur totale, d'environ 88% au niveau du domaine carboxy-terminal (Cter) et 85% pour le domaine amino-terminal (Nter) [18].

2.2- Structure moléculaire de la protéine

Dans les années 1990, plusieurs ANX de la famille A ont été cristallisées, la première étant l'ANXA5 humaine [19]. Ces études ont mis en évidence une structure commune des annexines composées d'un domaine Cter conservé et d'un domaine Nter plus variable. L'ANXA1 a été cristallisée en trois temps. **(i)** En 1993, Weng et ses collaborateurs ont étudié la structure tridimensionnelle de l'ANXA1 tronquée de ses 32 premiers AA en Nter en présence de calcium. Ils ont identifié 6 ions calciums liés à la protéine [20]. **(ii)** En 2001, l'intégralité de la protéine a été cristallisée en absence de calcium [21]. **(iii)** Enfin, en 2003, Rosengarth et ses collaborateurs ont étudié la conformation de l'ANXA1 sous sa forme pleine longueur en présence de calcium. Ils ont mis en évidence non plus 6 mais 8 ions calcium associés au domaine Cter. Cependant ils ne sont pas parvenus à obtenir le domaine Nter intact [22]. A l'heure actuelle, on ne dispose donc pas d'une forme cristalline de l'ANXA1 sous sa forme entière et intacte en présence de calcium.

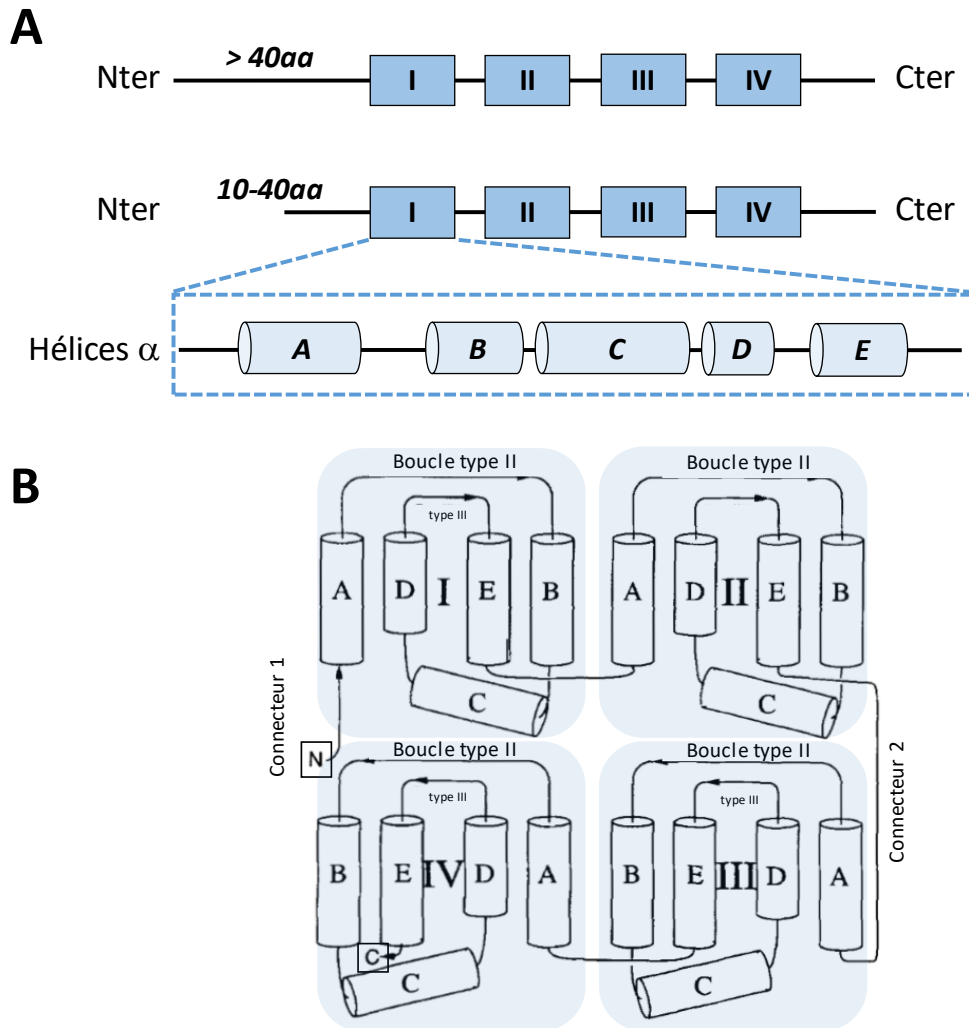


Figure 3 : Structure protéique de l'annexine A1. (A) Structure protéique linéaire de l'ANXA1. L'ANXA1 se compose comme toutes les annexines d'un domaine carboxy-terminal (Cter) appelé cœur protéique et d'un domaine amino-terminal (Nter). Le domaine cœur se compose de quatre motifs répétés (I, II, III et IV). Chacune de ces répétitions est elle-même composée de 4 hélices α nommées d'A à E. Le domaine Nter peut avoir différentes longueurs en fonction des annexines. (B) Structure protéique topologique de l'ANXA1. Les hélices A, D, E et B sont parallèles les unes aux autres tandis que l'hélice C est presque perpendiculaire. Cette dernière fait le lien entre la partie Cter de l'hélice B et Nter de l'hélice D. Les répétitions I et IV ainsi que II et III sont reliées par des connecteurs ce qui permet de générer une structure compacte. Les sites de liaison au calcium de type II sont présents au niveau des boucles qui relient les hélices A et B et les types III au niveau de celles qui relient les hélices D et E.

Adapté de Weng et al, 1993 [20]

2.2.1- Domaine carboxy-terminal : cœur protéique

Le domaine Cter, également appelé cœur protéique, est commun et conservé entre toutes les annexines. Il comprend 4 motifs répétés de 70 à 80 AA à l'exception de l'ANXA6 qui comprend 8 motifs [23]. Pour l'ANXA1, les répétitions se composent de 72 résidus sauf la répétition III qui en comprend 73. Chacune des répétitions est composée de 5 hélices α (A à E), dont 4 (A,B,D,E) en orientation antiparallèle et une (C) presque perpendiculaire aux autres [8]. Cette dernière connecte donc la partie Cter de l'hélice B à la partie Nter de l'hélice D. Les hélices sont reliées entre elles par des boucles, créant ainsi des motifs « hélice-boucle-hélice ». Les répétitions I/IV et II/III sont reliées entre elles de façon non covalente et covalente respectivement par des connecteurs (**Figure 3**). Cette organisation confère au cœur protéique une structure compacte, résistante aux protéases [23]. Les répétitions conservent une structure tridimensionnelle commune mais présentent entre elles une homologie de séquence de 25-35% (meilleure homologie entre répétition II et IV) et entre annexines de 45-55% avec la plus grande variabilité au niveau de la répétition III [6], [7], [24].

Le cœur protéique présente une structure en disque, légèrement incurvée avec une partie convexe et une partie concave qui présente les extrémités Cter et Nter. La partie convexe possède des sites de liaison au calcium et aux PL. Les sites de liaison au calcium présents au niveau de chaque répétition diffèrent en termes de structure et d'affinité des sites de type « main E-F » (type I) décrits chez les protéines de liaison au calcium telles que la calmoduline. En effet, on retrouve chez les annexines deux autres types de motif de liaison pour le calcium, les motifs de type II et ceux de type III. Ces motifs sont présents au niveau de boucles plus courtes que les motifs de type I et forment une liaison plus ouverte avec les ions calcium afin de permettre la liaison des PL. En effet les motifs de types I séquestrent presque complètement le calcium, limitant ainsi les interactions avec d'autres molécules [20]. Les sites de type II ont été cartographiés au niveau des boucles reliant les hélices A et B (boucle AB). Ils présentent une affinité pour le calcium inférieure au motif de type I. Les sites de type III sont quant à eux présents au niveau des boucles reliant les hélices D et E (boucle DE) (**Figure 3B**). Ils sont moins affins vis-à-vis du calcium par rapport aux types II [20], [24]. Au niveau de l'ANXA1, les sites de liaison sont répartis comme suit [22]:

- Répétition I, III et IV : un site type II et un site type III
- Répétitions II : deux sites type II

| | | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|---------|-----|-----|--------------|
| 10 | 20 | ▲ | * | **30 | 40 | * | 50 |
| MAMVSEFLKQ | AWFIENEEQE | YVQTVKSSKG | GP | SAVSPYP | T | FN | PSSDVAA |
| 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | | | |
| LHKAIMVKGV | DEATI IDILT | KRNNAQRQOI | KAAYLQETGK | PL | DE | TL | LKKAL |
| 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | | | |
| TGHLEEVVLA | LLKTPAQFDA | DELRAAMKGL | GT | DED | TL | IEI | LASRTNKEIR |
| 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | | | |
| DINRVYREEL | KRDLAKDITS | DTSGDFRNAL | LS | LAK | GDR | SE | DFGVNEDLAD |
| 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | | | |
| SDARALYEAG | ERRKGTDVNV | FNTILTTRSY | PQLRRVFQKY | TK | YS | KH | DMNK |
| 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | | | |
| VLDLELKGDI | EKCLTAIVKC | ATSKPAFFAE | KL | HQ | AM | KG | VGTRHKALIRIM |
| 310 | 320 | 330 | 340 | | | | |
| VSRSEIDMND | IKAFYQKMYG | ISLCQAILDE | TK | G | DY | E | KILVALCGGN |

Figure 4 : Séquence protéique de l'annexine A1. L'ANXA1 se compose de 346 acides aminés. Le domaine amino-terminal (en rouge) se compose de 41 résidus. La répétition I (bleue) s'étend du résidu 42 au 113, la II (verte) du résidu 114 au 185, la III (orange) du résidu 197 à 269 et pour finir la IV (jaune) du résidu 273 à 344. Le domaine amino-terminal est la cible de phosphorylation par différentes protéines comme le récepteur au facteur de croissance épidermique : EGFR (triangle) et la protéine kinase C (étoile): PKC.

Lors de la liaison périphérique de la partie convexe de la molécule aux PL membranaires, l'orientation des répétitions est modifiée de sorte que les sites de liaison au Ca^{2+} deviennent coplanaires à la membrane [8]. Ces derniers forment alors un « pont » qui connecte l'annexine aux PL. La sensibilité au Ca^{2+} ainsi que la spécificité de liaison aux PL du domaine cœur peuvent être variables entre les différentes annexines [14]. La liaison du domaine cœur aux PL membranaires, en présence de Ca^{2+} , est réversible et peut rapidement être perturbée par l'ajout d'un chélateur du calcium comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) et l'acide éthylène glycol tétraacétique (EGTA) [8].

2.2.2- Domaine amino-terminal : domaine régulateur

Contrairement au domaine cœur, la partie Nter est très variable entre les annexines, à la fois en termes de longueur et de séquence. De ce fait, c'est cette partie qui confère la spécificité de chaque annexine. La taille de ce domaine varie entre 11 et 19 AA pour la grande majorité des annexines mais peut également atteindre plus de 100 AA pour les ANXA7 et ANXA11 [8], [14], [21]. L'ANXA1 et l'ANXA2 présentent un domaine Nter plutôt intermédiaire avec respectivement 41 et 32 acides aminés. Le domaine Nter de l'ANXA1 possède une structure en hélice sur ses 26 premiers acides aminés et une région charnière de 15 résidus qui le relie au cœur protéique. Cette région charnière présente une importante sensibilité aux clivages protéolytiques [21] contrairement au domaine cœur qui est résistant.

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence que ce domaine est la cible de diverses modifications post-traductionnelles, particulièrement des phosphorylations [25]. En effet, la partie Nter de l'ANXA1 est le substrat de différentes protéines kinases. Les phosphorylations ont principalement lieu au niveau d'acides aminés de type tyrosine, sérine et thréonine. Plusieurs travaux ont montré une phosphorylation du résidu tyrosine 21 (Tyr^{21}) par le récepteur EGFR (« *epidermal growth factor receptor* ») [26]–[29] ou encore des résidus sérine 27 et 28 (Ser^{27} , Ser^{28}), thréonine 24 et 41 (Thr^{24} et 41) par la protéine kinase C (PKC) (**Figure 4**) [28], [30]–[33]. Ces modifications post-traductionnelles régulent à la fois les fonctions, la localisation cellulaire, mais également le clivage de l'ANXA1. Par exemple, la phosphorylation du résidu Ser^{27} est associée à une diminution des capacités d'agrégation membranaire de l'ANXA1 [31], [32]. Cette phosphorylation est aussi impliquée dans la translocation de l'ANXA1 du cytoplasme à la membrane, ce qui permet d'exposer la protéine à la surface des cellules folliculo-stellaires de l'hypophyse [33]. Le résidu Tyr^{21} phosphorylé par l'EGFR est quant à lui associé à une rétention de l'ANXA1 au niveau nucléaire [29]. De plus, l'ANXA1 phosphorylée

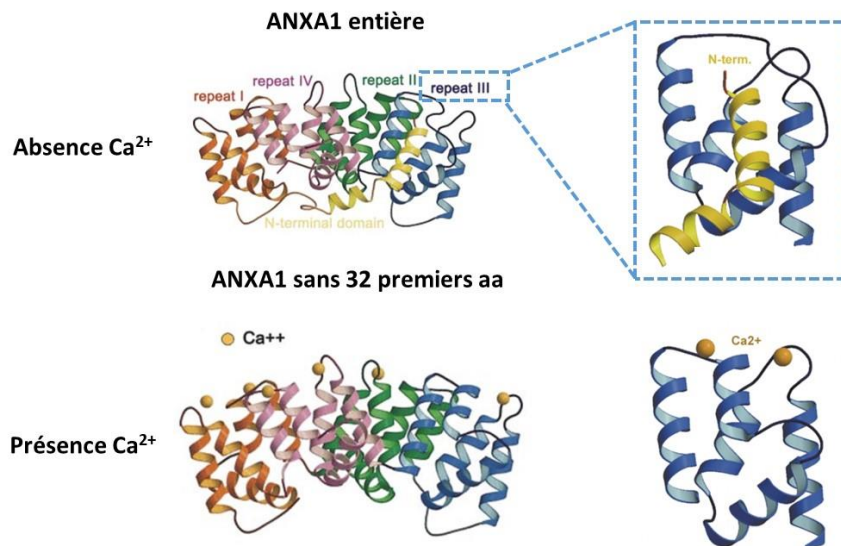


Figure 5 : Conformation de l'annexine A1 en absence et en présence de calcium. Les études de cristallographie ont permis de mettre en évidence deux conformations différentes de l'annexine A1 en présence ou en absence de calcium. En absence de calcium, le domaine amino-terminal (jaune) est enclavé dans le cœur protéique au niveau de la répétition III à la place de l'hélice D. En présence de calcium, le domaine amino-terminal est expulsé du domaine cœur et devient ainsi accessible pour exercer ses fonctions.

Adapté de Rosengarth et al, 2001&2003 [21-22]

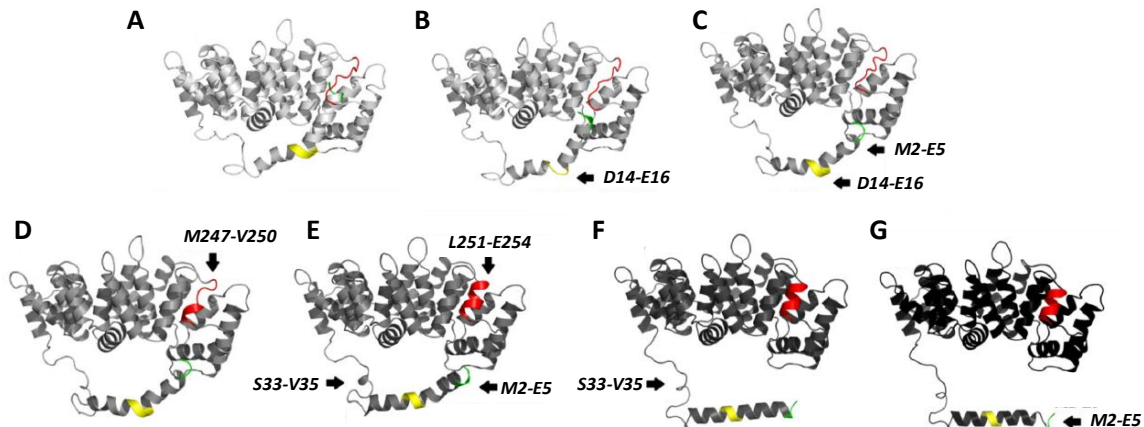


Figure 6 : Modélisation du changement conformationnel de l'annexine A1 en présence de calcium.

(A) Lorsque le domaine Nter est enclavé dans le domaine Cter, l'extrémité du domaine Nter (verte) est recouverte par une boucle de la répétition III (rouge). Différents types de changement de conformation (flèches) vont ensuite se succéder pour permettre le retrait du domaine Nter et son exposition à l'extérieur du domaine cœur. (B) Dépliage des résidus D14-E16 qui perdent leur structure secondaire et forme une boucle. (C) Les résidus D14-E16 reprennent leur conformation en hélice et les résidus M2-E5 perdent leur structure secondaire. A ce stade, le domaine Nter est presque entièrement retiré du cœur protéique. (D) Acquisition d'une structure en hélice des résidus M247-V250. (E) Acquisition d'une structure en hélice des résidus L251-E254, S33-V35 et M2-E5. (F) Les résidus S33-V35 retrouvent une structure en boucle et le domaine Nter s'éloigne du domaine Cter. (G) Pour finir, les résidus M2-E5 perdent à nouveau leur structure secondaire.

Adapté de Lewis et al., 2019 [34]

au niveau des acides aminés Tyr²¹ ou Ser²⁷ présente une sensibilité plus importante au clivage protéolytique [27], [32].

En plus des modifications post-traductionnelles que peut subir le domaine Nter, ce dernier est également capable d'interagir avec des ligands à la fois protéiques ou lipidiques. Ces interactions confèrent à l'ANXA1 différentes fonctions telles que l'agrégation membranaire qui sera décrite dans le paragraphe 3.1.1 de cette première partie. Il est de ce fait important que la protéine possède une conformation permettant une bonne accessibilité du domaine Nter à ses différents partenaires.

2.2.3- Changement conformationnel de l'ANXA1 en présence de calcium

La cristallographie de l'ANXA1 pleine longueur en absence de calcium a permis de mettre en évidence une structure atypique, qui ne reflète pas le repliement classique du domaine cœur précédemment identifié. En effet, la partie Nter possède 26 acides aminés organisés sous forme de deux hélices α (Ala²-Asn¹⁶ et Glu¹⁸-Lys²⁶). Ces deux hélices sont inclinées l'une par rapport à l'autre avec un angle d'environ 60° au niveau du résidu glutamate 17 (Glu¹⁷). En absence de calcium, l'hélice amphiphile qui correspond aux douze premiers acides aminés est insérée dans le domaine cœur à la place de l'hélice D de la répétition III. Cette conformation semble donc être associée à une forme inactive de la protéine (**Figure 5**) [21].

Des études réalisées en présence de calcium, ont mis en évidence un retour de l'hélice D de la répétition III dans le domaine cœur et une exposition du domaine Nter à l'extérieur du cœur protéique. Dans ces conditions, la partie Nter se retrouve accessible et disponible pour d'éventuelles modifications post-traductionnelles et/ou interaction avec des ligands [22]. Une étude récente *in silico* a permis de mieux comprendre les étapes intermédiaires permettant de passer d'un état inactif de la protéine (Nter enclavé dans le domaine cœur) à un état actif (Nter exposé à l'extérieur du domaine cœur) [34]. Les auteurs ont mis en évidence un retrait progressif du domaine Nter basé sur des changements structuraux permettant de le rendre plus flexible et de favoriser son expulsion du cœur protéique (**Figure 6**).

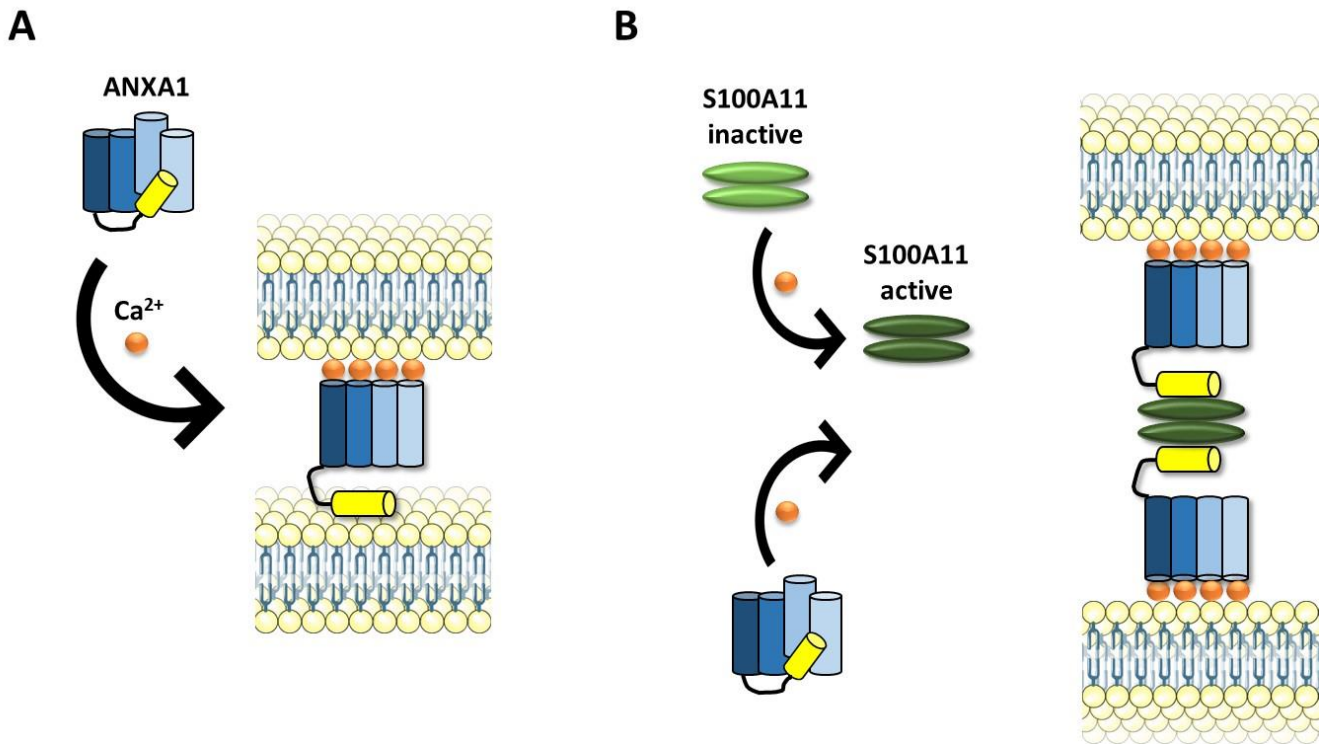


Figure 7 : Mécanismes d'agrégation membranaire de l'annexine A1. L'ANXA1 est capable d'agréger des membranes. Deux mécanismes possibles semblent pouvoir expliquer ce phénomène. **(A)** L'ANXA1 est capable de se lier aux phospholipides membranaires de façon dépendante du calcium par l'intermédiaire de son domaine carboxy-terminal. Le domaine amino-terminal est également capable de se lier aux phospholipides permettant ainsi à une seule molécule d'annexine A1 d'interagir avec deux membranes différentes. **(B)** L'ANXA1 est capable de se fixer à la protéine dimérique S100A11 par l'intermédiaire de son domaine amino-terminal. Cette dernière est activée par le calcium tout comme l'annexine. Le dimère S100A11 est capable de se lier à deux ANXA1 différentes interagissant chacune avec une membrane. Ceci permet donc, par le biais de la protéine S100A11 qui forme un « pont », d'agréger deux membranes éloignées.

3- Diversité fonctionnelle de l'ANXA1

Les annexines ont principalement été caractérisées par leur capacité à se lier de façon réversible et dépendante du calcium aux PL membranaires chargés négativement. Il n'est donc pas surprenant d'observer que l'ANXA1, comme d'autres protéines de la famille des annexines, est capable de moduler des événements intracellulaires liés aux membranes tels que l'agrégation et le trafic vésiculaire [12], [14], [35], [36]. Elle a également été très largement décrite au niveau de la réponse immunitaire et possède notamment un rôle majeur dans l'inflammation.

3.1- Régulation du trafic membranaire

3.1.1- ANXA1 et agrégation membranaire

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de l'ANXA1 à agréger les membranes [35]. Elle est par exemple capable de stimuler l'agrégation des liposomes ou encore celle des granules des neutrophiles [37], [38]. Deux hypothèses majeures ont été proposées pour expliquer ce phénomène.

La première se base sur la possibilité qu'une seule molécule d'ANXA1 soit capable d'interagir avec deux membranes différentes, ce qui nécessite donc la présence de deux sites de liaison différents au niveau de la protéine (**Figure 7A**). L'ANXA1 est capable d'interagir avec les PL membranaires de façon dépendante du calcium grâce à son domaine cœur. L'utilisation de protéines dites « chimères » créées à partir de l'ANXA1 et de l'ANXA5 a permis de mieux comprendre le rôle primordial de la partie Nter dans le processus d'agrégation. En effet, l'ANXA5 n'est pas capable de stimuler l'agrégation des vésicules phospholipidiques (à pH7) contrairement à la chimère I_NV_C composée du domaine Nter de l'ANXA1 et du domaine Cter de l'ANXA5 [39], [40]. On peut également noter que les deux protéines présentent par contre des capacités de liaison aux PL similaires. De surcroît, contrairement à l'ANXA5, la protéine chimère fixée à une bicouche lipidique planaire stimule l'adhésion des vésicules de PL au niveau de cette dernière [40]. Cette observation est donc en faveur de la présence d'un second site de liaison aux PL localisé au niveau du domaine Nter de l'ANXA1. Rosengarth et ses collaborateurs ont mis en évidence la capacité de ce domaine à se lier aux PL membranaires sans nécessiter de calcium à pH6 [41]. Au niveau cellulaire, un tel pH peut être atteint dans certains organites comme les endosomes ou encore les lysosomes [42]. Ce potentiel second site de liaison localisé au niveau du domaine Nter de l'ANXA1 n'est pas spécifique d'un type de PL en particulier contrairement aux sites de liaison du

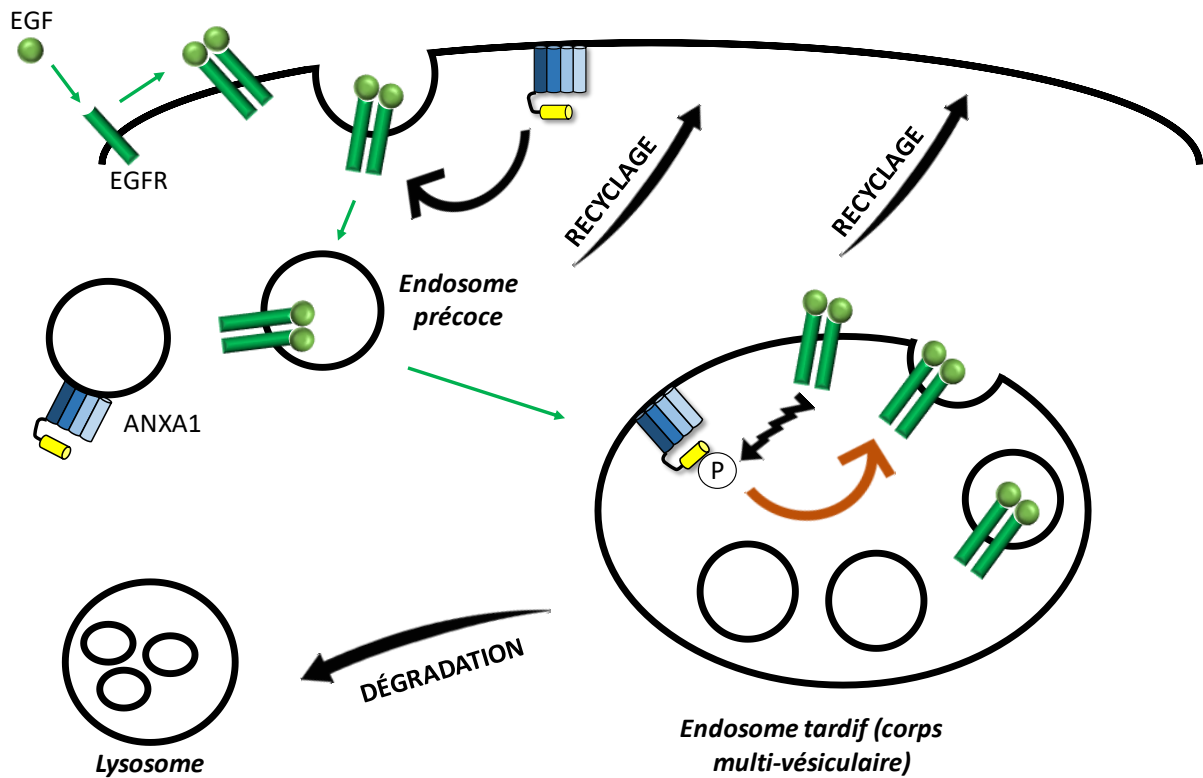


Figure 8 : Implication de l'annexine A1 dans l'endocytose du récepteur à l'EGF (EGFR). Lors de son activation par le facteur de croissance épidermique EGF, l'EGFR se dimérise et s'auto-phosphoryle afin de déclencher différentes cascades de signalisation. Une fois activé, le récepteur va être internalisé afin d'être soit recyclé soit dégradé. Cette internalisation passe par la voie des endosomes précoces et tardifs. L'ANXA1 est impliquée dans ce processus. En absence d'EGF, l'ANXA1 est localisée au niveau des endosomes précoces. Suite à l'activation du récepteur, l'ANXA1 se relocalise au niveau des endosomes tardifs où elle sera phosphorylée au niveau de son résidu Tyr²¹ par l'EGFR. Ceci va permettre de stimuler la formation de vésicules à l'intérieur de l'endosome tardif.

domaine Cter [40]. Pour aller plus loin, l'utilisation d'ANXA1 tronquée en Nter a permis d'identifier les résidus 25 à 29 comme étant importants pour l'activité d'agrégation membranaire notamment les lysines 26 et 29 [43]. Ces observations rendent donc plausible l'hypothèse qu'une seule molécule d'ANXA1 soit capable de lier deux membranes.

La seconde hypothèse se base sur l'implication d'une protéine intermédiaire faisant le lien entre deux ANXA1 différentes, toutes deux en interaction avec une membrane. Cette hypothèse est basée sur l'interaction de l'ANXA1 avec une protéine de la famille S100. Ces protéines possèdent des sites de liaison au calcium de type « main EF » [44]. L'ANXA1 interagit spécifiquement avec la protéine homodimérique S100A11. Cette dernière doit d'abord se lier au calcium afin de subir un changement conformationnel permettant l'association rapide de chacun des monomères du dimère avec une molécule d'ANXA1 liée à une membrane. Cet intermédiaire protéique joue ainsi le rôle de pont entre les deux membranes et permet, via son interaction avec l'ANXA1, l'agrégation membranaire [45]. Le site de liaison des protéines S100A11 avec l'ANXA1 se situe au niveau des dix à quatorze premiers AA du domaine Nter de l'ANXA1 [14]. On peut noter ici, que l'ANXA2 est également capable d'agréger les membranes en interagissant avec une autre protéine de la famille S100 de façon indépendante du calcium: S100A10 [35]. Contrairement à la première hypothèse qui sous-entend que les membranes liées entre elles par une molécule d'ANXA1 soient proches, l'interaction avec les protéines S100A11 intermédiaires permet de lier deux membranes plus éloignées (**Figure 7B**).

3.1.2- ANXA1 et trafic vésiculaire

Chez les Eucaryotes, deux grandes voies sont impliquées dans le trafic vésiculaire : l'endocytose et l'exocytose. Ces deux processus correspondent respectivement à l'internalisation et à l'externalisation/sécrétion de molécules. L'ANXA1 est capable de moduler ces deux processus [14], [36], [46].

L'implication de l'ANXA1 dans l'**endocytose** a été soulevée par des études montrant une localisation de cette protéine au niveau des endosomes précoces et des corps multi-vésiculaires (CMV) correspondant aux endosomes dits tardifs. Les endosomes constituent une station de tri qui va déterminer si une protéine doit être recyclée ou détruite par fusion des vésicules avec un lysosome (**Figure 8**). Une première étude a mis en évidence une interaction préférentielle de l'ANXA1 avec les endosomes tardifs plutôt que précoces. De plus cette interaction a été décrite comme étant indépendante de la présence de calcium [47]. Cependant, une autre analyse a montré des résultats opposés en observant que l'ANXA1 se lie plutôt aux endosomes précoces de façon dépendante du

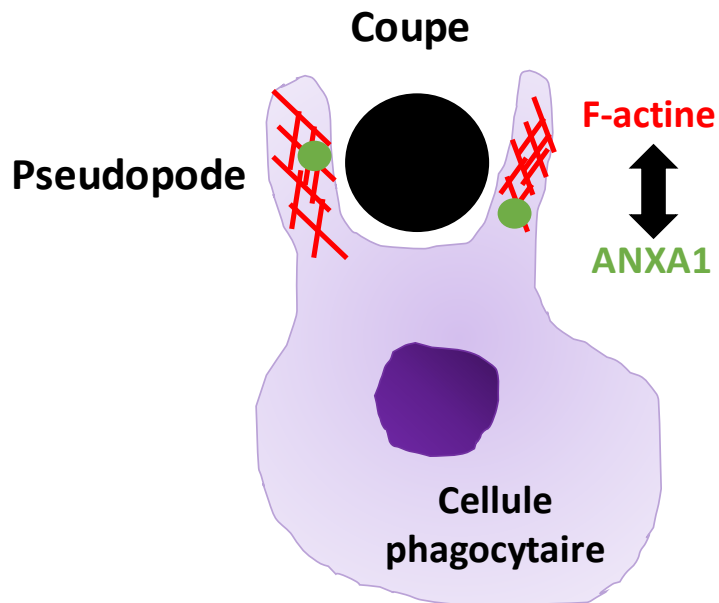
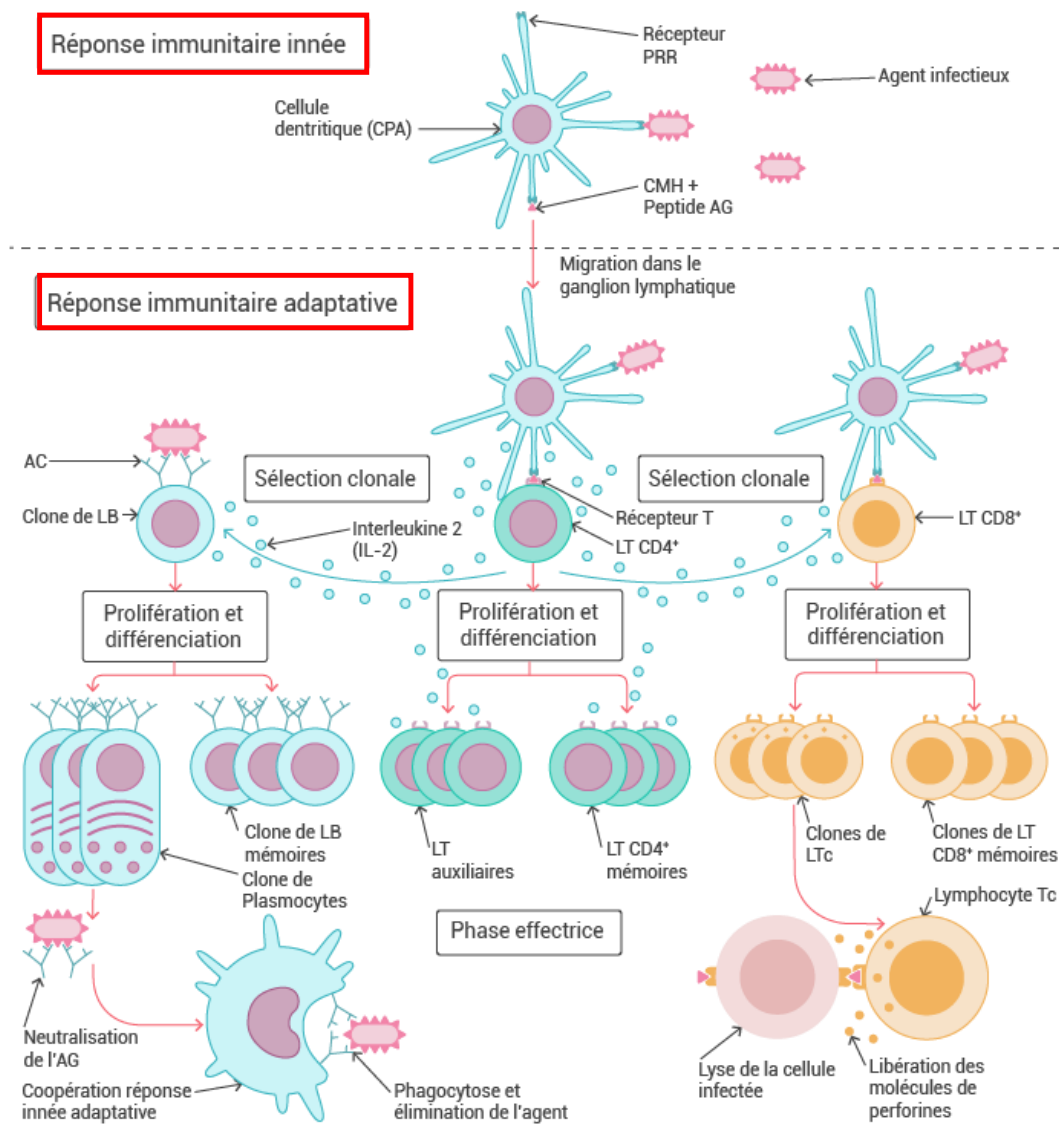


Figure 9 : Implication de l'annexine A1 dans la formation de la coupe phagocytaire. Lors de la phagocytose, les cellules phagocytaires donnent naissance à des pseudopodes grâce à une réorganisation de la protéine du cytosquelette : F-actine. Ses pseudopodes vont former une « coupe » en entourant la particule à phagocyter (cercle noir). L'ANXA1 co-localise avec la F-actine et stimule ainsi la formation de la « coupe ».

calcium [48]. En 2000, Rescher et ses collaborateurs ont souhaité éclaircir cette contradiction en réalisant pour la première fois une étude dans un contexte cellulaire à l'aide de la lignée HeLa, cellules dérivant d'un cancer du col de l'utérus. Ils ont montré l'interaction préférentielle de l'ANXA1 au niveau des endosomes précoces, grâce à l'utilisation d'une protéine chimère couplée à la GFP. Ils ont également confirmé l'importance du calcium dans cette interaction par l'utilisation de protéines dont les sites de liaison au calcium de type II ont été invalidés. Ils sont aussi allés plus loin en montrant que la protéine ANXA1-GFP tronquée de son domaine Nter se distribue en opposition à la protéine sauvage au niveau des endosomes tardifs [49]. Ceci souligne donc l'importance du domaine Nter et conforte une précédente étude ayant montré que l'absence du domaine Nter est associée à une localisation au niveau des CMV [48]. Finalement, il semble que le domaine cœur de l'ANXA1 soit plutôt associé à une localisation calcium dépendant de la protéine au niveau des endosomes tardifs et que le domaine Nter, quant à lui, entraîne une relocalisation au niveau des endosomes précoces. L'étude de Seeman et ses associés a identifié les AA 13 à 26 comme étant impliqués dans cette relocalisation [48].

Le processus d'endocytose est impliqué dans la modulation de la signalisation cellulaire puisque de nombreux récepteurs sont internalisés après activation par leur(s) ligand(s). C'est notamment le cas de l'EGFR qui suite à la fixation du ligand EGF (« *epidermal growth factor* ») est activé (dimérisation et auto-phosphorylation) puis internalisé. L'ANXA1 étant un substrat de l'EGFR, plusieurs équipes ont donc étudié l'implication de cette protéine dans l'internalisation du récepteur [50]. C'est en 2006 que White et ses associés ont mis en évidence un rôle fonctionnel de l'ANXA1 dans l'internalisation de l'EGFR. Suite à l'activation de ce récepteur par l'EGF, l'ANXA1 se relocalise au niveau des endosomes tardifs. Elle devient ensuite la cible de la phosphorylation en Tyr21 par l'EGFR et stimule la formation de vésicules à l'intérieur de l'endosome tardif. En absence d'EGF, l'ANXA1 est présente au niveau des endosomes précoces (**Figure 8**) [51].

L'internalisation de particules peut aussi se faire par une forme particulière d'endocytose, la phagocytose. Ce processus permet d'internaliser des pathogènes dans le cadre de l'immunité dans des vésicules nommées phagosomes et de mener à leur élimination. Le cytosquelette joue un rôle déterminant dans ce processus, notamment pour la formation de la coupe qui correspond au développement de pseudopodes (prolongements) autour de la particule à phagocyter (**Figure 9**). Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de l'ANXA1 à moduler les capacités phagocytaires des cellules telles que les macrophages (cf partie 1, paragraphes 3.2.3 et 3.2.4). Cette protéine est capable de stimuler la liaison entre la F-actine, protéine du cytosquelette, et les phagosomes. La diminution de l'expression de l'ANXA1 dans la lignée cellulaire de macrophages RAW 264.7 entraîne un effet inhibiteur sur les étapes de la phagocytose liées à la F-actine, notamment la formation de la coupe. La co-localisation spatiale et temporelle de l'ANXA1 avec la F-actine au cours des stades précoces et



© Banque de schémas SVT Dijon

Figure 10 : Acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative. L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. Cette réponse est immédiate, non spécifique et implique les cellules phagocytaires résidentes ou sanguines tels que les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules sont capables de reconnaître des signaux de danger grâce aux récepteurs PRR (« *pattern recognition receptor* ») et ainsi de s'attaquer directement aux pathogènes en déclenchant notamment une réaction inflammatoire. Si la réponse innée n'est pas suffisante, la réponse adaptative va alors être déclenchée. Cette dernière est donc plus tardive mais spécifique. Dans un premier temps, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques vont stimuler les cellules lymphocytaires par l'intermédiaire de leur CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Cette présentation se déroule au niveau des organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques. Suite à la sélection clonale, les différents types de lymphocytes vont proliférer et se différencier en cellules capables de s'attaquer spécifiquement aux pathogènes donnés comme les lymphocytes T cytotoxiques (LTc) ou encore les plasmocytes capables de sécréter des anticorps (AC) spécifiques. Ces anticorps vont faciliter la phagocytose des agents pathogènes et créer ainsi une coopération entre la réponse innée et adaptative.

tardifs de la phagocytose suggère une fonction régulatrice de l'ANXA1 vis-à-vis de cette protéine du cytosquelette [52].

L'**exocytose** joue un rôle primordial dans les voies de sécrétion et implique la fusion des membranes vésiculaires avec la membrane plasmique afin de libérer le contenu vésiculaire à l'extérieur des cellules. L'ANXA1 a suscité un intérêt dans l'étude de l'exocytose au vu de ses capacités à interagir avec deux membranes en même temps. De plus, comme vu précédemment, la fixation de l'ANXA1 à une bicouche lipidique favorise l'adsorption de vésicules phospholipidiques au niveau de cette dernière [40]. Plusieurs études ont mis en lumière la capacité de l'ANXA1 à stimuler la fusion des lysosomes entre eux, et de ces derniers avec la membrane plasmique [37] ou encore avec les granules des neutrophiles [38]. Au niveau des neutrophiles, il a été montré que l'ANXA1 permet de mettre en contact les granules et la membrane de façon dépendante du calcium, permettant ainsi de favoriser leur exocytose [38]. L'ANXA1 semble également être impliquée dans la sécrétion de l'insuline. Ce phénomène se produit au niveau des cellules β des îlots pancréatiques lors d'un apport en glucose. La comparaison de rats traités par voie orale avec du glucose avec des rats restés à jeun pendant une nuit (12h) a permis de montrer que l'administration de glucose augmente de façon significative le niveau d'ANXA1 associé aux granules d'insuline au niveau des cellules β . En effet, le glucose induit la translocation de l'ANXA1 du cytosol aux granules d'insuline. Ce dernier permet également d'augmenter la phosphorylation de l'ANXA1 (résidu sérine) par la PKC, parallèlement à la libération de l'insuline. L'ensemble de ces données laisse donc penser que l'ANXA1 et sa phosphorylation sont impliquées dans le processus de sécrétion de l'insuline induit par le glucose [53].

3.2- Régulation de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire est un processus complexe impliquant un grand nombre de cellules différentes. Elle permet de protéger l'organisme contre des agressions de différents types et de conserver ainsi l'homéostasie des tissus. Cette réponse est finement régulée et contrôlée par des médiateurs chimiques entre autres afin de ne pas devenir pathologique. En effet une réponse immunitaire exacerbée et/ou prolongée peut être associée à des dommages tissulaires. La première ligne de défense lors d'une agression est la réponse dite « innée », elle est rapide et non spécifique. La réponse inflammatoire fait partie de cette première lignée de défense. Elle implique des cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les monocytes/macrophages. La réponse adaptative est quant à elle plus tardive, spécifique, et fait intervenir les cellules lymphocytaires (**Figure 10**) [54].

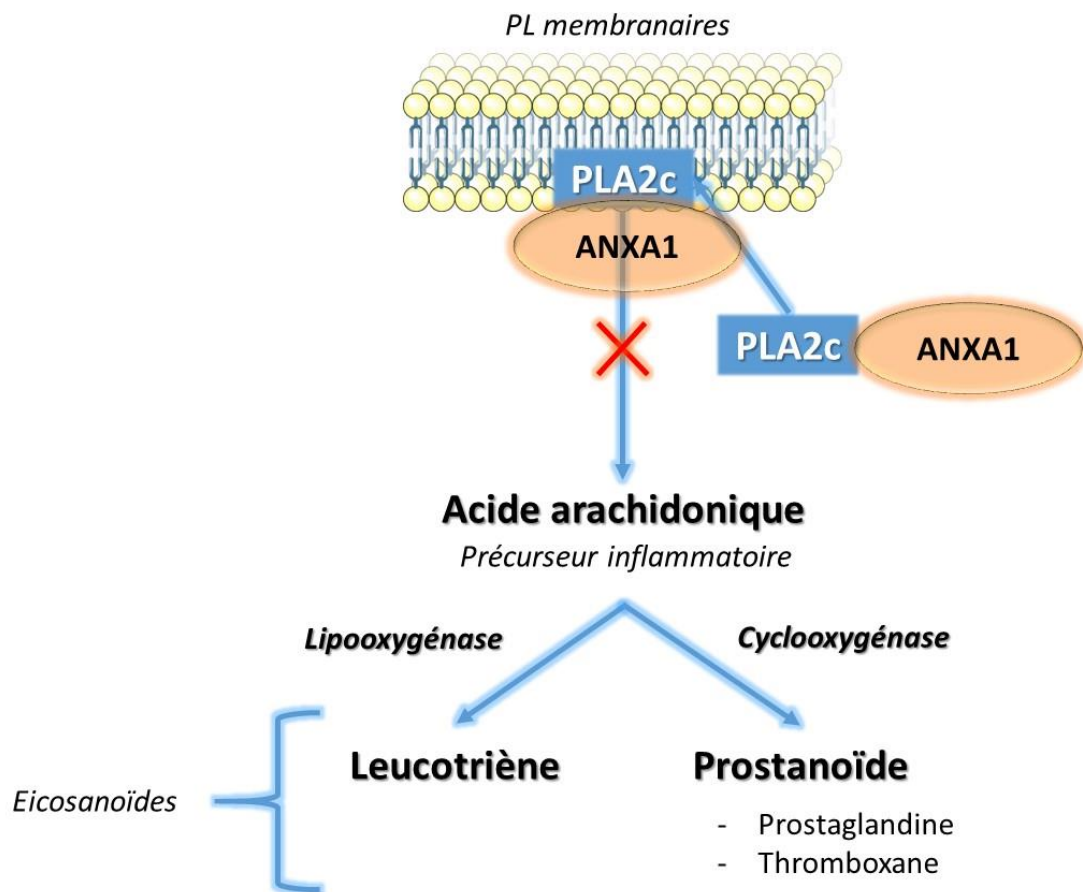


Figure 11 : Inhibition de la phospholipase A2 (PLA2) par l'annexine A1. La PLA2 cytosolique (PLA2c) est capable de synthétiser de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Ce dernier est le précurseur pro-inflammatoire pour la synthèse d'éicosanoïdes : les leucotriènes et les prostanoïdes. L'ANXA1 est capable d'inhiber l'activité de la PLA2. Deux hypothèses sont possibles : soit l'ANXA1 interagit directement avec la PLA2c afin d'inhiber son activité soit indirectement en séquestrant son substrat. En effet, l'ANXA1, en se liant aux phospholipides, les rend indisponibles pour leur interaction avec l'enzyme. A l'heure actuelle, les deux hypothèses restent en suspens mais la majorité des études sont favorables à l'action indirecte de l'ANXA1.

L'ANXA1 a initialement été décrite comme médiateur des effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes (GC). Ceci a notamment été confirmé chez des souris invalidées pour l'*Anxa1*, qui présentent une inflammation exacerbée ainsi qu'une résistance aux GC [55]. Les GC sont également capables de stimuler l'expression de l'ANXA1 ainsi que sa translocation membranaire par l'intermédiaire de sa phosphorylation [56]. Jusqu'à maintenant, le promoteur de l'ANXA1 ne semble pas contenir d'élément de réponse aux GC ce qui suggère un rôle transcriptionnel indirect [57]. Le lien entre l'expression de l'ANXA1 et les GC a également été mis en lumière *in vivo*. En effet, l'injection d'hydrocortisone chez des sujets sains augmente l'expression de l'ANXA1 au niveau des monocytes [58]. Une autre étude réalisée sur des sujets présentant une sécrétion normale ou dérégulée de cortisol (ex : maladie d'Addison) a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre l'expression de l'ANXA1 au niveau des neutrophiles et la concentration sérique du cortisol [59]. A l'inverse de l'effet stimulateur des GC sur l'ANXA1 au niveau des cellules du système immunitaire inné, ces derniers limitent l'expression de l'ANXA1 dans les lymphocytes *in vitro* et *in vivo* [60].

La place de l'ANXA1 dans la réponse innée inflammatoire est aussi documentée du fait de l'expression et du rôle de cette protéine dans les cellules telles que les neutrophiles ou encore les monocytes/macrophages humains [61]. Malgré une faible expression dans les lymphocytes, l'ANXA1 joue également un rôle dans la réponse immunitaire adaptative. Plusieurs études tendent également à montrer que l'expression de l'ANXA1 est augmentée avec la différenciation des cellules. Ainsi, le niveau d'ANXA1 est plus élevé dans les macrophages que dans les monocytes [62] et dans les lymphocytes différenciés par rapport aux naïfs [57]. Nous allons reprendre dans cette partie, les rôles les plus décrits de l'ANXA1 dans la réponse immunitaire en se restreignant aux types cellulaires les plus documentés.

3.2.1- Inhibition de la phospholipase A2 (PLA2) médiateur pro-inflammatoire

Plusieurs études ont mis en évidence les capacités de l'ANXA1 endogène à inhiber la PLA2 cytosolique (PLA2c) et donc à limiter la synthèse d'acide arachidonique, d'où son activité anti-inflammatoire. En effet, l'acide arachidonique est un précurseur inflammatoire de la synthèse d'eicosanoïdes : les leucotriènes et les prostanoides (prostaglandine et thromboxane), synthétisé par l'hydrolase PLA2c. Les enzymes impliqués dans ces réactions sont les lipooxygénases et les cyclooxygénases (COX1 et COX2) respectivement (**Figure 11**). Il a par exemple été montré que la transfection de cellules U937 (monocyte) avec un ADNc anti-sens de l'ANXA1 entraîne une diminution d'expression de cette dernière dans les cellules, associée à une augmentation de l'activité de la PLA2

[63]. Une autre étude a permis de confirmer *in vivo* la modulation de la PLA2c par l'ANXA1 dans un modèle de souris dont le gène qui code cette dernière a été invalidé. Ces animaux présentent par rapport aux sauvages une augmentation du niveau protéique de la PLA2c et de COX2 dans certains tissus comme le poumon. Cette observation confirme bien la régulation négative de ces enzymes par l'ANXA1 [55].

Au vu des capacités de l'ANXA1 à se lier aux PL membranaires, l'hypothèse de l'inhibition de la PLA2 par séquestration du substrat (les PL) a rapidement émergée. Plusieurs études ont supporté cette idée et l'une d'entre elles a notamment montré que la pré-incubation de l'ANXA1 avec les PL entraîne une inhibition de l'activité de la PLA2 plus importante que la pré-incubation de l'ANXA1 avec l'enzyme [64]. D'autres données comme celles de Kim et de ses collaborateurs sont plutôt en faveur d'une interaction spécifique directe entre l'ANXA1 et la PLA2. Ils ont éliminé la possibilité d'une séquestration du substrat en montrant que l'inhibition de la PLA2 est indépendante de la concentration en substrat et qu'elle existe même lorsque le substrat est en excès par rapport à l'ANXA1. De plus, ils ont montré que l'activité PLA2 est diminuée après immunoprécipitation de l'ANXA1 avec un anticorps spécifique, mettant en lumière la possible interaction directe entre les deux protéines [65]. Cette interaction a été confirmée par une analyse montrant la co-immunoprécipitation de l'ANXA1 et la PLA2c dans des hépatocytes murins stimulés par l'EGF (**Figure 11**) [12], [66].

Si une incertitude existe sur le mécanisme d'inhibition de la PLA2 par l'ANXA1, l'hypothèse de la séquestration du substrat reste favorisée [5]. De plus, d'autres annexines telles que l'ANXA2 et l'ANXA5 sont également capables d'inhiber la PLA2 [64]. Comme les annexines partagent toute la capacité de liaison aux PL (via le domaine cœur commun), ceci pourrait expliquer l'inhibition non spécifique de la PLA2 par l'ANXA1, soutenant ainsi un mécanisme d'inhibition indirect. Contrairement à cet effet sur la PLA2, l'ANXA1 module de façon spécifique les neutrophiles en inhibant leur migration trans-endothéliale et en stimulant leur apoptose [67].

3.2.2- Régulation des neutrophiles

3.2.2.1- Régulation de la migration trans-endothéliale (MTE)

La migration trans-endothéliale (MTE) ou transmigration correspond au passage d'une cellule du compartiment sanguin au compartiment tissulaire. Dans un contexte inflammatoire, les cellules immunitaires sanguines notamment les polynucléaires neutrophiles sont rapidement recrutées au

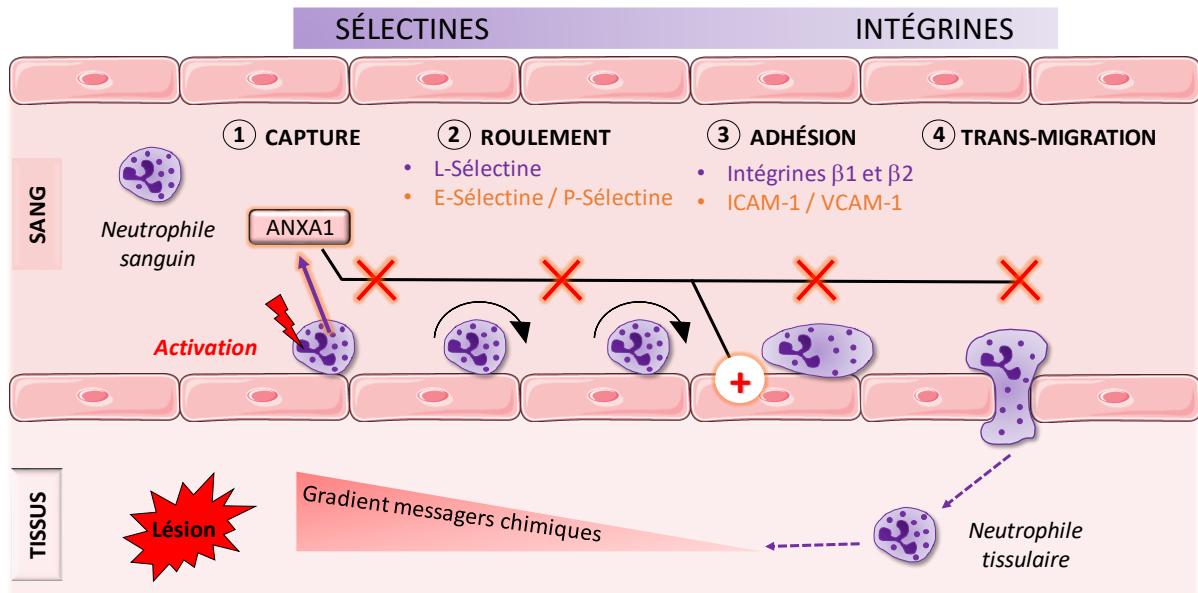


Figure 12 : Effet de l'annexine A1 sur la migration trans-endothéliale des neutrophiles. Lors d'une agression tissulaire, les neutrophiles sanguins sont recrutés au niveau de la lésion, guidés par un gradient de messagers chimiques. Ce recrutement est possible grâce à la migration trans-endothéliales de ces cellules c'est-à-dire leur passage du compartiment sanguin au compartiment cellulaire. Ce processus comprend différentes étapes : la capture correspondant à la fixation faible des neutrophiles à l'endothélium, le roulement de ces derniers le long des cellules endothéliales puis l'adhésion ferme et le passage à travers la barrière endothéliale. Ces processus sont régulés dans un premier temps par des protéines de type sélectine au niveau des neutrophiles (violet) et des cellules endothéliales (orange) puis par des intégrines et des protéines de liaisons de types ICAM et VCAM. Lors de leur adhésion aux cellules endothéliales, les neutrophiles libèrent de l'annexine A1 dans le milieu environnant. Cette protéine est capable d'inhiber différentes étapes de la migration trans-endothéliale en agissant sur les récepteurs de la famille des FPR (récepteur aux peptides formylés). Elle est notamment capable de réguler négativement la L-sélectine impliquée dans les processus de capture et de roulement. Cependant, l'annexine A1 a plutôt un rôle stimulateur au niveau des cellules endothéliales en jouant sur le regroupement des protéines ICAM.

niveau du tissu endommagé. Ce recrutement, indispensable à la mise en place de la réponse immunitaire innée, nécessite plusieurs étapes. Dans un premier temps, les neutrophiles vont s'attacher faiblement aux cellules endothéliales par l'intermédiaire de protéines de types sélectine (L-sélectine pour les neutrophiles et E-sélectine et P-sélectine pour les cellules endothéliales). Cette capture permet aux neutrophiles de pouvoir par la suite rouler sur la paroi endothéliale, aidés par le flux sanguin. Une adhésion ferme a ensuite lieu grâce à l'interaction des intégrines des neutrophiles avec les molécules d'adhésion des cellules endothéliales ICAM-1 (« *intercellular adhesion molecule 1* ») et VCAM-1 (« *vascular cell adhesion molecule 1* »). Finalement, le neutrophile traverse la barrière endothéliale et gagne le tissu lésé, guidé par un gradient de messagers chimiques (chimioattractants) (**Figure 12**) [5], [68]. La restriction de l'infiltration des leucocytes est essentielle au contrôle et à la résolution de l'inflammation.

Un grand nombre d'études s'est consacré à élucider le rôle de l'ANXA1 dans le processus de MTE des neutrophiles. En 1996, Perretti et ses collaborateurs ont montré que l'ANXA1 est externalisée et sécrétée lorsque les polymorphonucléaires (PMN, composés à 99% de neutrophiles) humains adhèrent à une surface endothéliale [69]. On estime qu'entre 50 et 70% de l'ANXA1 se retrouve à la surface cellulaire dans ces conditions [10]. Cette protéine ne possède pas le peptide signal indispensable à la sécrétion classique impliquant le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi [62], [70]. Cependant au sein des neutrophiles plus de 60% de l'ANXA1 est stockée au niveau des granules de gélatinase. Elle peut donc rapidement être mobilisée à la surface cellulaire par exocytose de ces derniers lorsque les neutrophiles sont activés par adhésion aux cellules endothéliales [57]. Ce phénomène est spécifique puisqu'aucune externalisation n'a été observée après adhésion des PMN à une surface plastique, ni suite à l'utilisation de PMN non adhérents. De plus le traitement avec un anticorps dirigé contre l'ANXA1 s'est montré efficace pour augmenter la MTE des PMN sans modifier leur adhésion. Ceci s'est traduit *in vivo* par une augmentation du nombre de PMN recrutés dans la cavité péritonéale de souris présentant une péritonite suite à l'injection intra-péritonéale de zymosan [69]. L'utilisation de souris génétiquement inactivées pour l'*Anxa1* a confirmé l'augmentation du recrutement des PMN au site inflammatoire dans ce même modèle de péritonite. L'analyse des PMN a montré chez ces souris une augmentation du niveau basal d'expression de la L-sélectine impliquée dans les processus de capture et de roulement [55]. L'ensemble de ces données démontre le rôle anti-inflammatoire de l'ANXA1 endogène qui inhibe la MTE des neutrophiles (**Figure 12**).

La présence de deux formes d'ANXA1 (37 kDa et 33 kDa) dans le surnageant des PMN humains adhérents, traités ou non avec un chélateur du calcium (EDTA) permettant de décrocher l'ANXA1 membranaire, montre qu'une fois externalisée, l'ANXA1 subit un clivage protéolytique, vraisemblablement au niveau de sa partie Nter. Au niveau de la membrane externe, l'ANXA1 est

majoritairement sous forme intacte (37 kDa) et une fois sécrétée majoritairement sous forme clivée (33 kDa) [69]. Deux hypothèses sont alors possibles. Soit ce clivage inactive la protéine et régule ainsi ses effets, soit il permet de libérer une forme plus active comme par exemple la partie Nter qui constitue un peptide bioactif capable d'agir de façon autocrine et paracrine. Des études ont donc visé à mieux comprendre ce clivage et se sont focalisées sur l'analyse des protéases des neutrophiles comme l'élastase (NE), la protéinase 3 (PR3) et la calpaïne I. En 2007, Vong et ses collaborateurs ont confirmé que le clivage de l'ANXA1 a lieu au niveau de la membrane et non au niveau du cytosol. Ils ont montré que la PR3 est capable de cliver l'ANXA1 de façon plus efficace que la NE. De plus, contrairement à cette dernière, la PR3 co-localise avec l'ANXA1 dans les neutrophiles, particulièrement lorsqu'ils sont activés [71]. L'utilisation d'une protéine résistante au clivage par PR3 a permis de mettre en évidence *in vitro* et *in vivo* que le clivage de l'ANXA1 limite son activité anti-inflammatoire sur les PMN. En effet, les PMN incubés avec la protéine mutante et perfusés au niveau de cellules endothéliales présentent des capacités inhibitrices de la capture, du roulement et de l'adhésion plus importantes que les PMN en présence de la protéine sauvage. De plus, la co-administration intradermique de la protéine résistante avec une molécule qui stimule l'accumulation des PMN diminue de façon plus importante que la protéine sauvage le recrutement des PMN et l'inflammation [72]. Le clivage de l'ANXA1 par la calpaïne I est quant à lui associé à la libération d'une forme active de 33 kDa capable de moduler les cellules endothéliales en stimulant la signalisation ERK (« *extracellular signal-regulated kinases* ») et le regroupement des protéines ICAM-1 autour des neutrophiles. A l'inverse, le peptide Ac2-26 qui mime une partie du domaine Nter de l'ANXA1 n'a pas d'effet sur les cellules endothéliales. Cette action est donc associée spécifiquement au domaine cœur de la protéine [67], [73]. L'ensemble de ces données favorise donc un rôle pro-inflammatoire du clivage.

L'analyse des facteurs impliqués dans la résolution de l'inflammation (anti-inflammatoires) présente un grand intérêt pour la découverte de nouvelles thérapies dans le cadre des maladies auto-immunes et de l'inflammation chronique. Il est donc important de pouvoir mieux comprendre leur mode d'action. L'ANXA1 a été très largement décrite comme molécule limitant le processus inflammatoire, notamment en inhibant le recrutement des neutrophiles comme décrit ci-dessus. Un grand nombre de recherches a donc utilisé de l'ANXA1 recombinante ainsi que le peptide Ac2-26 afin d'étudier l'effet de l'ANXA1 exogène sur la transmigration des neutrophiles et d'élucider son mode d'action. Si la plupart des études ont été réalisées en conditions statiques, une analyse de Hayhoe et ses collaborateurs a permis d'élucider l'impact de l'ANXA1 exogène dans des conditions plus physiologiques. En effet, ils ont utilisé un système de « chambre à flux » qui permet de perfuser de façon constante les PMN humains sur une surface de cellules endothéliales et de mimer ainsi le flux

Tableau 2 : Pourcentage d'identité en acides aminés des différents récepteurs FPR humains (FPR) et murins (Fpr). Adapté de Ye et al, 2009 [76]

| Noms | FPR1 | FPR2 | FPR3 | Fpr1 | Fpr-rs1 | Fpr2 | Fpr-rs3 | Fpr-rs4 | Fpr-rs5 | Fpr-rs6 | Fpr-rs7 |
|-------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| FPR1 | 100 | <u>68</u> | <u>58</u> | <u>77</u> | 59 | 64 | 55 | 51 | 54 | 51 | 51 |
| FPR2 | | 100 | <u>72</u> | 68 | <u>73</u> | <u>76</u> | 65 | 61 | 64 | 59 | 58 |
| FPR3 | | | 100 | 56 | 60 | 63 | 54 | 52 | 58 | 52 | 52 |
| Fpr1 | | | | 100 | 57 | 62 | 53 | 51 | 55 | 51 | 50 |
| Fpr-rs1 | | | | | 100 | 82 | 65 | 61 | 63 | 58 | 59 |
| Fpr2 | | | | | | 100 | 66 | 64 | 64 | 59 | 60 |
| Fpr-rs3 | | | | | | | 100 | 77 | 78 | 74 | 73 |
| Fpr-rs4 | | | | | | | | 100 | 74 | 73 | 73 |
| Fpr-rs5 | | | | | | | | | 100 | 64 | 62 |
| Fpr-rs6 | | | | | | | | | | 100 | 95 |
| Fpr-rs7 | | | | | | | | | | | 100 |

Tableau 3 : Liste non exhaustive des ligands des récepteurs FPR1 et FPR2. Adapté de Ye et al, 2009 [76]

| Ligands | Agonistes | Antagonistes | Sélectivité |
|----------------------------|-----------|--------------|--------------|
| fMLP | X | | FPR1 > FPR2 |
| WKYMVM | X | | FPR2 > FPR1 |
| Lipoxine A4 | X | | FPR2 |
| Ac2-26 | X | | FPR1 et FPR2 |
| ANXA1 | X | | FPR2 |
| tBoc | | X | FPR1 > FPR2 |
| WRW4 | | X | FPR2 > FPR1 |
| Ciclosporine A et H | | X | FPR1 |

sanguin. Ils ont pu mettre en évidence un effet inhibiteur du peptide Ac2-26 sur la capture et le roulement mais pas sur l'adhésion des PMN. Ceci se traduit notamment par une forte inhibition de l'expression de la L-sélectine. Au contraire, l'ANXA1 sous sa forme totale inhibe seulement le processus d'adhésion [74]. La perte de la L-sélectine a également été rapportée suite à l'utilisation de l'ANXA1 recombinante humaine [75].

Sur le plan mécanistique, c'est en 2000 que Walther et ses associés ont mis pour la première fois en évidence la capacité du domaine Nter de l'ANXA1 à activer les récepteurs aux peptides formylés (FPR) au niveau des neutrophiles [67]. La famille des récepteurs FPR est composée de trois membres chez l'homme : FPR1, FPR2 (FPRL1, ALXR, LXA4R) et FPR3 (FPRL2). Le récepteur FPR2 présente 68% d'identité protéique avec FPR1. FPR3, quant à lui, possède 58% d'identité avec FPR1 et 72% avec FPR2. Chez la souris, la famille est plus complexe puisqu'elle se compose de 8 membres. Le récepteur Fpr1 est l'orthologue de FPR1 (77% d'identité). Les récepteurs Fpr-rs1 et Fpr-rs2 (Fpr2) correspondent plutôt à FPR2 (**Tableau 2**) [76]. Ce sont tous des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G de type inhibitrice. Cette dernière mène à l'activation de la phospholipase C et à la libération du calcium des stocks intracellulaires [62]. Si de nombreux ligands endogènes et synthétiques (agonistes et antagonistes) sont connus pour FPR1 et FPR2 (**Tableau 3**), le récepteur FPR3 est dit orphelin. Cependant il a été montré que l'ANXA1 est capable de se lier à ce dernier [77]. Les FPR sont principalement exprimés au niveau des leucocytes mais sont également présents au niveau d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales et endothéliales [57], [78].

De par la variété de leurs ligands, les récepteurs FPR peuvent déclencher à la fois des signalisations pro- et anti-inflammatoires [79]. Au niveau des neutrophiles, seuls les récepteurs FPR1 et FPR2 sont présents [74]. L'utilisation d'antagonistes des FPR ou de souris invalidées pour ces récepteurs a permis de confirmer leur implication dans la régulation du recrutement des neutrophiles par l'ANXA1. Dans les deux cas, on observe *in vivo* une inhibition des effets anti-migratoires/adhésifs du peptide Ac2-26 et également une diminution de la liaison de l'ANXA1 aux leucocytes circulants [80], [81]. L'étude des interactions entre l'ANXA1 et les récepteurs FPR1 et FPR2 a permis de démontrer que le peptide Ac2-26 est capable de se lier et d'activer les deux récepteurs contrairement à la protéine totale qui active seulement FPR2. L'activation de ces deux récepteurs est associée à une stimulation de la signalisation de type MAPK (« *mitogen-activated protein kinases* ») impliquant la protéine ERK [74]. De plus, il a été montré que l'ANXA1, par le biais de son domaine Nter, est capable de désensibiliser les FPR en limitant la mobilisation intracellulaire du calcium, ce qui prévient leur nouvelle activation par des peptides pro-inflammatoires comme par exemple le peptide bactérien fMLP [67], [77].

De façon générale, l'ensemble de ces données présente un rôle double de l'ANXA1 sur la transmigration des neutrophiles. Effectivement, si le domaine Nter présente des effets anti-inflammatoires en inhibant ce processus par l'intermédiaire des récepteurs FPR, le cœur de la protéine (Cter) présente quant à lui un effet pro-inflammatoire au niveau des cellules endothéliales. Cependant, le rôle anti-inflammatoire de l'ANXA1 reste le plus documenté et ne se restreint pas à l'action sur la MTE. En effet, l'ANXA1 est aussi capable de moduler l'apoptose et l'efférocytose (phagocytose des cellules apoptotiques) des neutrophiles.

3.2.2.2- Régulation de l'apoptose et de l'efférocytose

Afin d'assurer la résolution de l'inflammation, indispensable au retour de l'homéostasie tissulaire, il est nécessaire de limiter le recrutement des cellules immunitaires mais également de stimuler leur apoptose afin qu'elles soient éliminées par les cellules phagocytaires. Ceci permet de prévenir l'activation excessive des neutrophiles par exemple, et l'exposition du tissu au contenu toxique de ces cellules [79]. Le lien entre annexines et apoptose évoque fortement l'ANXA5, très largement utilisée en recherche pour détecter les cellules en apoptose du fait de sa capacité à se lier aux PS exposées à la surface de ces cellules. Même si cette propriété n'est pas spécifique à l'ANXA5, cette dernière possède un domaine Nter très court par rapport aux autres ce qui la rend plus stable et facilite son utilisation.

En tant que molécule anti-inflammatoire, l'influence de l'ANXA1 sur l'apoptose des neutrophiles a été évaluée. L'incubation de PMN humains avec une ANXA1 recombinante humaine entraîne une accélération de l'apoptose de ces cellules, dépendante de l'augmentation du niveau intracellulaire de calcium. Cette activation de l'apoptose est notamment associée à une déphosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad (« *BCL2 associated agonist of cell death* ») qui est ainsi activée. Tout comme l'effet de l'ANXA1 sur la trans-migration des PMN, la capacité de l'ANXA1 exogène à stimuler l'apoptose des neutrophiles par le biais de son domaine Nter est spécifique. En effet l'ANXA5 n'est pas capable de mimer cet effet sauf lorsqu'on lui ajoute le domaine Nter de l'ANXA1 [75]. Dans un modèle murin de pleurésie (inflammation de la membrane qui recouvre les poumons, déclenchée par une injection intra-pleurale de LPS), l'injection d'un anti-sérum anti-ANXA1 avant le traitement à la dexaméthasone (glucocorticoïde) diminue de façon significative l'effet pro-apoptotique de cette dernière sur les neutrophiles recrutés au niveau de la cavité pleurale [82]. De plus, dans ce même modèle, l'administration locale du peptide Ac2-26 augmente considérablement le pourcentage de neutrophiles en apoptose au site inflammatoire. Ce traitement augmente également le niveau des

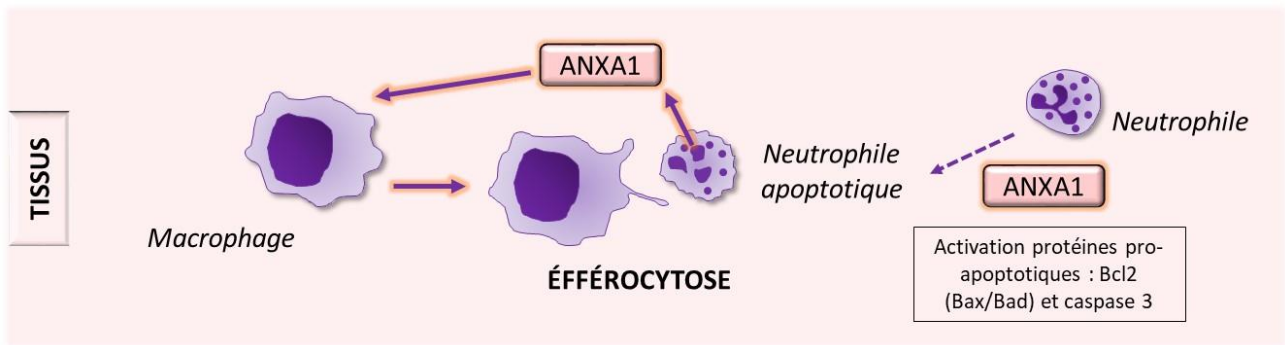


Figure 13 : Effet de l'annexine A1 sur l'apoptose et l'efférocytose des neutrophiles. L'ANXA1 est capable de stimuler l'apoptose des neutrophiles en activant notamment les protéines de la signalisation pro-apoptotique (Bad, Bax, caspase 3). De plus, les neutrophiles en apoptose sont eux-mêmes capables de sécréter de l'ANXA1 afin d'encourager leur phagocytose par les macrophages (efférocytose). L'ANXA1 extracellulaire agit par l'intermédiaire des récepteurs FPR présents au niveau des cellules phagocytaires.

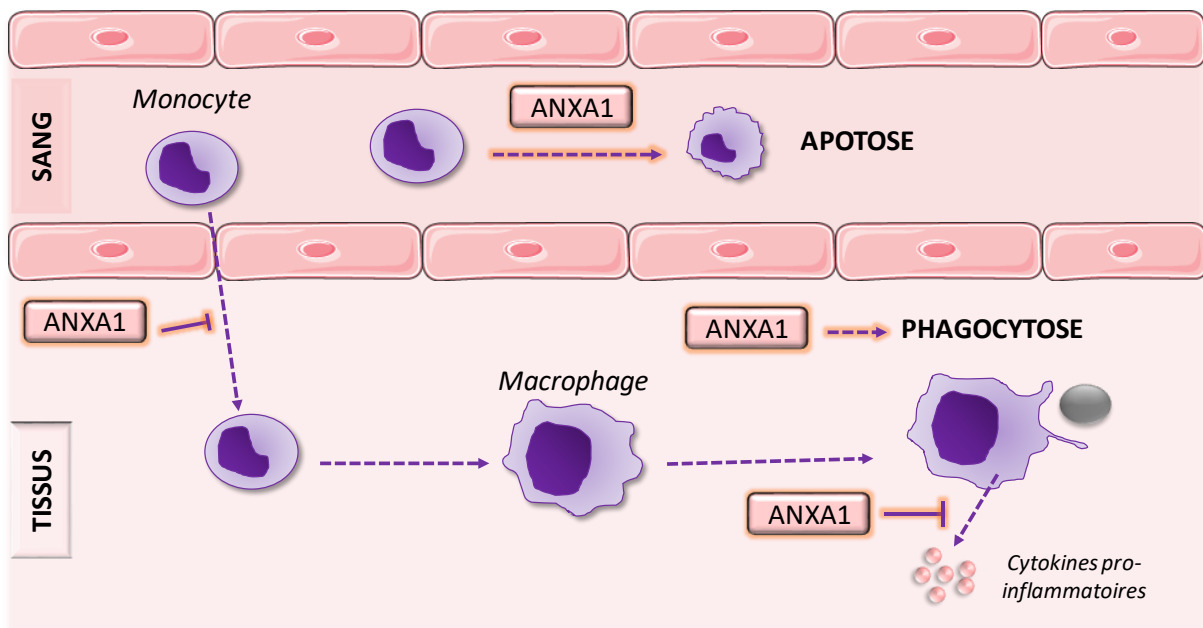


Figure 14 : Effet de l'annexine A1 sur les monocytes/macrophages. Une fois passés du compartiment sanguin au compartiment tissulaire, les monocytes se différencient en macrophages. Ces derniers constituent les principales cellules phagocytaires du système immunitaire et sont donc chargés d'éliminer les agents pathogènes ainsi que les cellules apoptotiques. L'ANXA1 est capable de moduler les monocytes et les macrophages de différentes façons. En effet, cette protéine peut à la fois stimuler leurs capacités phagocytaires et inhiber leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. De plus, l'ANXA1 inhibe la migration trans-endothéliale des monocytes et stimule leur apoptose.

protéines pro-apoptotiques Bax (« *BCL2 associated X* ») et caspase 3 clivée et diminue les protéines associées à la survie telles que MCL-1 (« *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein* ») et ERK1/2 (forme phosphorylée) dans les neutrophiles [82]. L'ensemble de ces données montre que l'ANXA1 endogène et exogène est capable de stimuler l'apoptose des neutrophiles *in vivo* (**Figure 13**).

Le surnageant de culture des neutrophiles apoptotiques présente plus d'ANXA1 que celui des cellules non apoptotiques et est capable de stimuler la phagocytose des macrophages. Cet effet stimulateur est abrogé lorsque l'ANXA1 du surnageant est éliminée ou lors de l'ajout d'un antagoniste FPR1/FPR2 (Boc2). Ces résultats montrent que les neutrophiles apoptotiques libèrent de l'ANXA1 qui va activer les récepteurs FPR au niveau des macrophages et stimuler ainsi leur efférocytose [83]. L'ANXA1 est donc capable de stimuler les phagocytes tels que les macrophages (**Figure 13**).

3.2.3- Régulation des monocytes/macrophages

Les monocytes sont des phagocytes sanguins dont la forme tissulaire correspond aux macrophages. Ces macrophages sont les principales cellules phagocytaires du système immunitaire. Comme vu précédemment, la phagocytose des cellules apoptotiques ou autres débris cellulaires, mais également des pathogènes est primordiale à la résolution de l'inflammation. Plusieurs études utilisant des souris n'exprimant pas l'*Anxa1* ont permis de mettre en évidence l'importance de cette protéine dans le processus de phagocytose. En effet les macrophages issus de ces souris présentent des défauts de phagocytose *in vitro* et *in vivo* [55], [84]. Récemment, il a été montré que le traitement de macrophages pulmonaires avec le peptide Ac2-26 stimule la phagocytose bactérienne de *S. pneumoniae in vitro* [85] (**Figure 14**). De plus, il a été montré que l'ANXA1 est capable d'opsoniser les cellules apoptotiques, dont les monocytes et les macrophages, via l'interaction de son domaine cœur avec les PS extracellulaires. Ceci permet de faciliter l'attachement des cellules phagocytaires et stimule ainsi l'efférocytose [86].

L'ANXA1 est également capable de moduler la sécrétion de cytokines par les macrophages. Lorsque les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées, elles dégénèrent en cellules nécrotiques. La présence d'ANXA1 à la surface de ces dernières permet de limiter la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (interleukine IL1- β , « *tumor necrosis factor alpha* » TNF α) par les macrophages qui les éliminent [86]. De plus, les macrophages de souris invalidées pour l'*Anxa1* libèrent plus de cytokines pro-inflammatoires (interleukine IL-6 et TNF α) par rapport aux macrophages des souris sauvages (WT, « *wild type* ») [84], [87]. *In vivo*, les souris invalidées, injectées en intra-péritonéal avec du LPS

bactérien, présentent une augmentation du niveau sérique d'IL-6 et de TNF α par rapport aux souris WT. L'ANXA1 endogène permet donc de limiter la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (**Figure 14**). Cette modulation passe par la diminution de l'activité des MAPK en limitant la phosphorylation de ERK et JNK (« *c-Jun N-terminal kinase* ») [87]. En effet, la diminution de l'expression de l'ANXA1 dans les macrophages est associée à une augmentation de la signalisation ERK. De plus, la surexpression de l'ANXA1 dans les macrophages RAW 264.7 est associée à une diminution de leur prolifération [88].

Tout comme pour les neutrophiles, l'ANXA1 est également capable de moduler l'afflux des monocytes au niveau du tissu lésé ainsi que leur apoptose. Effectivement, l'administration intraveineuse répétée du peptide Ac2-26 aux souris développant une péritonite suite à l'injection de zymosan, prévient l'infiltration de monocytes dans la cavité péritonéale [89]. De surcroit, les cellules monocytaires U937 qui surexpriment l'ANXA1 présentent une MTE réduite [90]. L'utilisation de souris n'exprimant pas l'*Anxa1* a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de la L-sélectine à la surface des monocytes par rapport aux animaux sauvages. L'ANXA1 endogène semble donc diminuer la présence de L-sélectine à la surface des monocytes et par conséquent diminuer leur TME [55]. De plus, la transfection de cellules U937 avec un ADNc codant pour l'ANXA1 induit chez ces dernières une apoptose spontanée. Le traitement de ces cellules avec l'ANXA1 (partie Nter + répétition I) potentialise les effets pro-apoptotiques du TNF α et augmente l'activité de la caspase 3. Globalement, l'ANXA1 présente donc une activité anti-inflammatoire au niveau des monocytes/macrophages en limitant leur afflux au niveau du site inflammatoire et en stimulant leur apoptose (**Figure 14**). De surcroit, une étude de puce à ADN a permis de montrer que le traitement de monocytes humains avec le peptide Ac2-26 entraîne une modulation de la transcription d'un grand nombre de gènes. Ces derniers sont dans la grande majorité impliqués dans les processus d'apoptose et d'inflammation. Les résultats de cette étude montrent que le peptide stimule la transcription des gènes anti-inflammatoires et inhibe celle des gènes pro-inflammatoires [91]. L'ANXA1 a également été associée à un rôle pro-inflammatoire. Une étude récente s'est consacrée à étudier l'implication de cette protéine dans la sécrétion d'IL-1 β pro-inflammatoire par les macrophages dérivés de moelle osseuse. Les résultats démontrent que l'absence d'ANXA1 dans les macrophages est associée à une réduction de la sécrétion de la cytokine en réponse à une stimulation par l'inflammasome NLRP3. De plus, cette action pro-inflammatoire est indépendante des récepteurs FPR et semble donc être liée à l'ANXA1 intracellulaire dans ce contexte spécifique [92].

3.2.4- Régulation des autres cellules phagocytaires

Outre le rôle régulateur important de l'ANXA1 sur les neutrophiles et les monocytes/macrophages, cette protéine module également d'autres cellules phagocytaires de l'immunité innée. Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPAg) capable de phagocyter les cellules en apoptose et d'activer les lymphocytes T (LT, immunité adaptative). Afin d'éviter le déclenchement de maladies auto-immunes ou de pathologies inflammatoires chroniques, il est important de prévenir la réponse immunitaire contre les antigènes du « soi » issus de cellules apoptotiques. En 2013, une étude a permis de mettre en évidence un rôle immunosuppresseur de l'ANXA1 présente à la surface des cellules apoptotiques vis à vis des CD. L'ANXA1 inhibe à la fois la maturation de ces cellules ainsi que leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires et à activer les LT. Ceci permet d'instaurer une tolérance vis-à-vis des cellules apoptotiques du « soi » [93]. A l'inverse, dans le cadre de la mort immunogénique, l'ANXA1 exposée à la surface des cellules tumorales stimule leur phagocytose par les CD et favorise ainsi l'activation de l'immunité adaptative anti-tumorale [94] (cf partie 3, paragraphe 2.1.2).

Au niveau du système nerveux central, les cellules microgliales constituent les macrophages résidents. En condition ischémique (privation en oxygène et en glucose puis ré-oxygénation), l'ANXA1 microgliale est phosphorylée par la PKC (Ser²⁷) ce qui déclenche sa translocation nucléaire et l'induction de la production de médiateurs pro-inflammatoires. Dans ce contexte, l'ANXA1 intracellulaire est donc impliquée dans un processus pro-inflammatoire [95]. D'autres cellules gliales non phagocytaires sont également impliquées dans l'inflammation du système nerveux central. Les astrocytes sont par exemple capables de sécréter des médiateurs inflammatoires. Il a été montré que le traitement de ces cellules avec le peptide Ac-26 permet de limiter leur activation induite par le LPS. De plus le peptide est capable d'inhiber la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les astrocytes [96].

De façon générale, la fonction anti-inflammatoire de l'ANXA1, notamment extracellulaire, a été très largement décrite. Cette fonction est en grande partie portée par le domaine Nter de la protéine qui par l'intermédiaire des récepteurs FPR est capable de moduler différentes cellules impliquées dans la réponse inflammatoire. La localisation intracellulaire ainsi que le domaine Cter sont plutôt impliqués dans l'inhibition de la PLA2, et dans certaines conditions, associés à des propriétés pro-inflammatoires. L'ANXA1 peut donc à la fois inhiber et stimuler la réponse immunitaire. Ceci a été notamment confirmé par l'analyse du rôle de cette protéine dans la réponse adaptative.

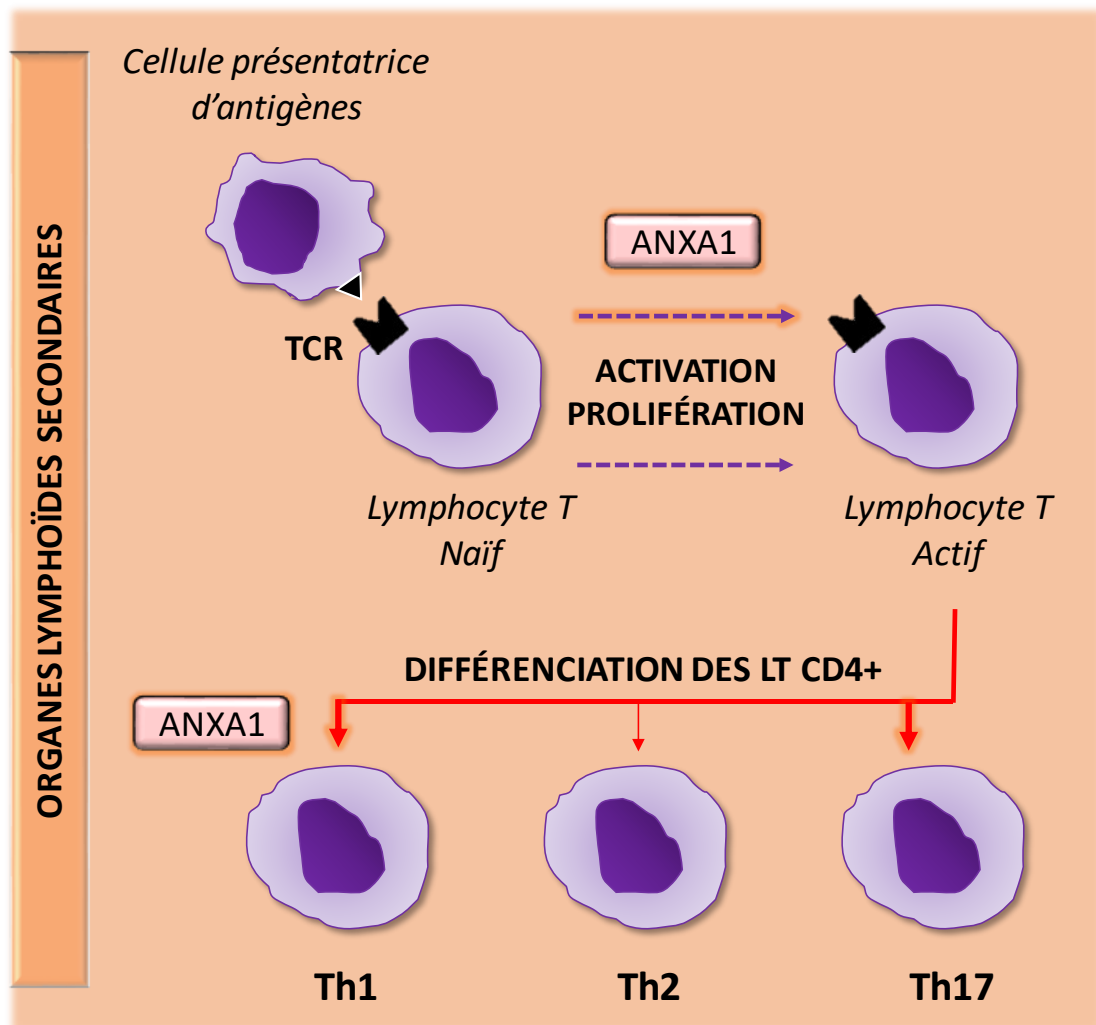


Figure 15 : Effet de l'annexine A1 sur l'activation et la différenciation des lymphocytes T. Les lymphocytes T (LT) naïfs sont activés au niveau des organes lymphoïdes secondaires comme par exemple les ganglions. L'activation passe par la reconnaissance d'un antigène protéique par le récepteur TCR. Une fois activés, les lymphocytes T peuvent se différencier en différents lymphocytes, dont les auxiliaires (CD4+) de type Th1, Th2 ou Th17. L'ANXA1 est capable de stimuler l'activation et la prolifération des lymphocytes et de favoriser la différenciation CD4+ en Th1 et Th17.

3.2.5- Régulation des lymphocytes (immunité adaptative)

Les lymphocytes sont les acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative. Il existe différents types de lymphocytes. Les LT sont les plus répandus, ils ont la capacité de détruire les pathogènes et de stimuler les lymphocytes B (LB). Ces derniers sont capables de produire des anticorps contre les pathogènes en ciblant des antigènes donnés. Les lymphocytes dit « *natural killer* » (NK) ou tueurs naturels présentent une cytotoxicité constitutive ne nécessitant pas d'exposition aux antigènes contrairement aux LT. Ces derniers se subdivisent également en LT cytotoxiques (CD8+) et auxiliaires ou « *helper* » (CD4+, Th).

D'Acquisto et ses collaborateurs ont été parmi les premiers à mettre en lumière un rôle stimulateur de l'ANXA1 vis-à-vis des lymphocytes. Ils ont montré que l'ANXA1 recombinante humaine est capable de stimuler la prolifération et l'activation des LT murins (sécrétion d'IL-2) (**Figure 15**) [97]. L'ANXA1 endogène est également capable de réguler ces deux paramètres puisque les cellules T invalidées génétiquement pour l'*Anxa1* présentent des défauts d'activation et une diminution de leur prolifération suite à leur stimulation [98]. Une étude récente a appuyé ces résultats en montrant que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'ANXA1 diminue l'activation et la prolifération des LT humain *in vitro*. Ces cellules sont issues de patients atteints de lupus érythémateux systémique (maladie auto-immune) et présentent une surexpression de l'ANXA1 par rapport aux lymphocytes des donneurs sains [99].

L'ANXA1 est également capable de moduler la différenciation des LT CD4+ en Th1 (médiateur immunité cellulaire), Th2 (médiateur immunité humorale associé aux cellules B) ou Th17 (auto-immunité, allergies). En effet, apportée de façon exogène, elle favorise la formation des Th1 au dépit des Th2 *in vitro* et *in vivo* (modèle arthrite induite par le collagène) [97]. Pour aller plus loin, une seconde étude sur l'ANXA1 endogène a permis de montrer que les LT déficients en ANXA1 se différencient plutôt en Th2 contrairement à ceux qui l'expriment (différenciation en Th1 et Th17) (**Figure 15**) [98].

La stimulation des cellules T via leur TCR (récepteurs des cellules T), entraîne une surexpression du récepteur FPR2 ainsi que son externalisation à la surface cellulaire. De façon simultanée, l'ANXA1 est également surexprimée et exportée à la membrane (mécanisme inconnu) pour être finalement sécrétée dans le milieu. Elle peut alors se lier aux récepteurs FPR2 et ainsi potentialiser la signalisation du TCR qui implique les protéines kinase ERK et AKT (ou PKB, protéine kinase B). De ce fait le seuil d'activation des cellules T est abaissé [97].

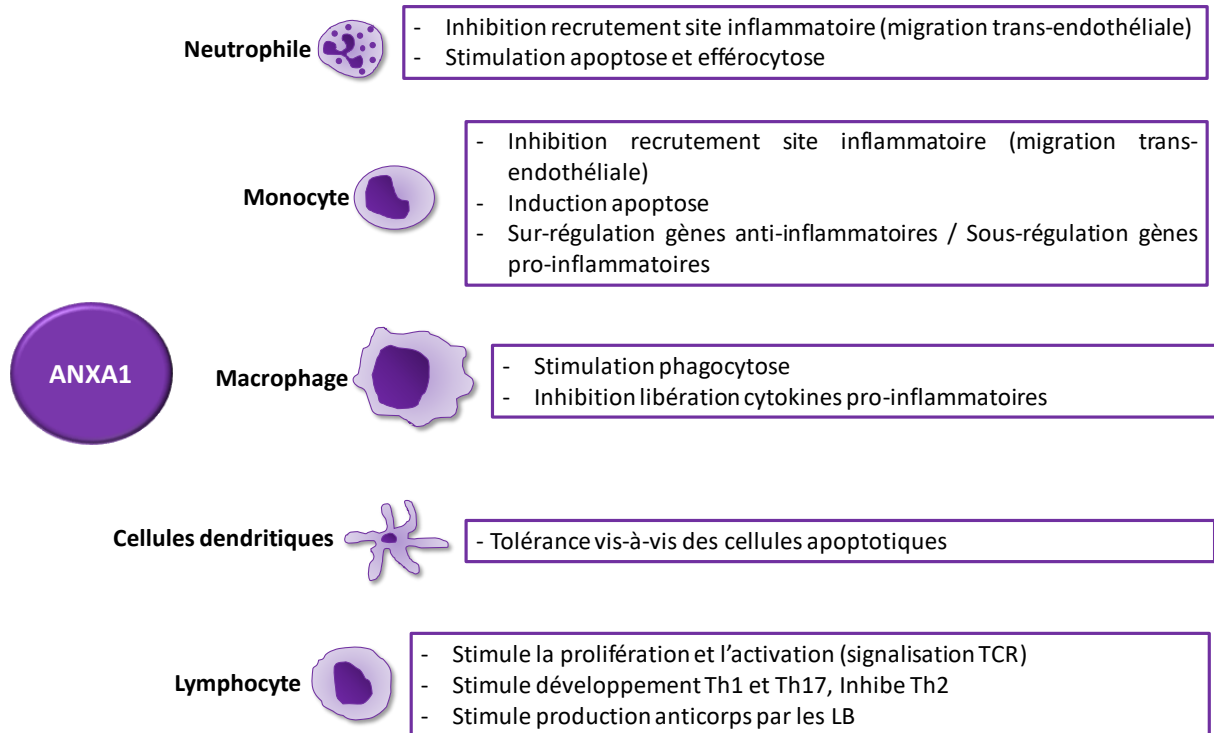


Figure 16 : Modulation des différentes cellules du système immunitaire par l'annexine A1. L'annexine A1 est capable de réguler la réponse immunitaire en jouant sur différents types cellulaires. Elle module par exemple, leur recrutement, leur apoptose, ou encore leurs fonctions.

Du fait du rôle pro-inflammatoire de l'ANXA1 envers les LT, il n'est pas étonnant de voir que le traitement des LT CD4+ avec des glucocorticoïdes entraîne une inhibition de l'expression de l'ANXA1 et ainsi une diminution de leur activation cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Ceci a été confirmé par une étude montrant que l'administration de GC aux patients atteints d'arthrite rhumatoïde entraîne une diminution de l'expression de l'ANXA1 dans les LT CD4+ allant de 50 à 80% par rapport à l'analyse réalisée avant traitement [60].

L'ANXA1 est également capable de stimuler la production d'anticorps par les plasmocytes (LB différenciées). En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-ANXA1 diminue la production d'auto-anticorps par les plasmocytes des patients atteints de lupus érythémateux systémique *in vitro* et *in vivo* (modèle souris SCID humanisée). Contrairement aux cellules du système immunitaire inné, l'ANXA1 inhibe l'apoptose des lymphocytes T et B [99].

Globalement, l'ANXA1 est capable de moduler le système immunitaire en agissant sur un grand nombre de types cellulaires (**Figure 16**). Elle limite le système immunitaire inné en modulant l'inflammation et stimule au contraire la réponse immunitaire adaptative par le biais de son action sur les différents types de lymphocytes.

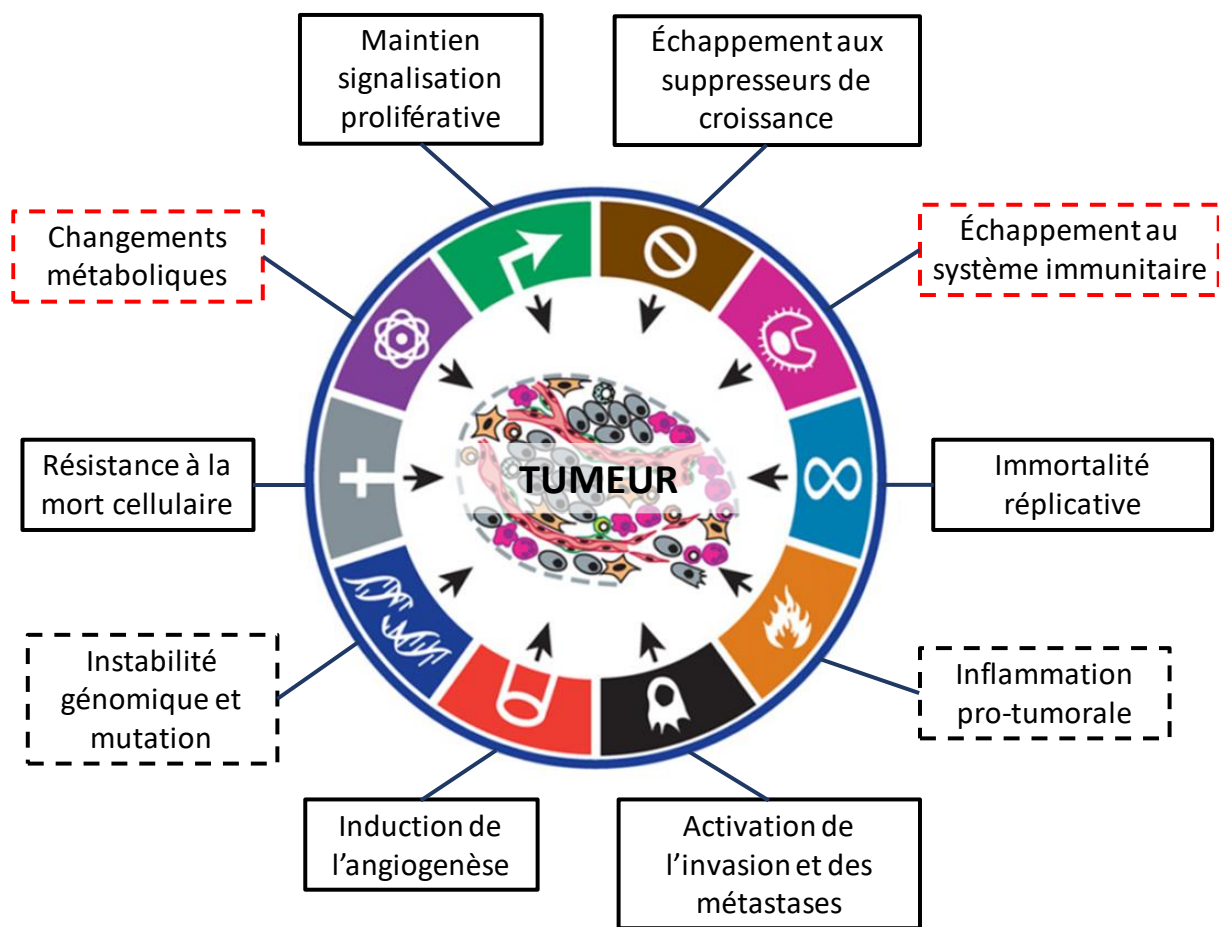


Figure 17 : Caractéristiques principales des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses peuvent être définies par six caractéristiques principales (traits pleins). Quatre d'entre elles sont liées à une prolifération incontrôlée et à la survie des cellules tumorales avec : le maintien de la signalisation proliférative, l'échappement aux suppresseurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, et l'acquisition d'une immortalité. Les deux autres caractéristiques que sont l'invasion et les métastases ainsi que l'induction de l'angiogenèse sont associées à l'agressivité et à la dissémination des cellules tumorales. L'ensemble de ces caractéristiques s'acquière principalement suite à l'instabilité génomique qui génère des mutations, et la mise en place d'une inflammation déclenchée par les cellules immunitaires qui peuvent pour certaines promouvoir la progression tumorale (traits pointillés noirs). Plus récemment, deux nouvelles caractéristiques ont émergé. En effet, les cellules tumorales modifient leur métabolisme énergétique afin de favoriser leur croissance et mettent en place des stratégies de résistance au système immunitaire (traits pointillés rouges).

Adapté de Hanahan et al, 2011 [100]

PARTIE 2 : ROLES DE L'ANNEXINE A1 DANS LA PROGRESSION TUMORALE

Au vu de la très vaste expression de l'ANXA1 dans les différents tissus humains et de son implication dans divers processus biologiques, plusieurs travaux ont visé à étudier son rôle dans différents cancers. Des analyses transcriptionnelles et/ou protéiques de biopsies de patients, ont permis de mettre en lumière la dérégulation de l'ANXA1 dans de nombreux cancers. Les cellules tumorales sont caractérisées principalement par une prolifération incontrôlée (soutien de la signalisation proliférative, échappement aux suppresseurs de croissance, résistance à la mort cellulaire) mais également des capacités agressives telles que la migration et l'invasion qui interviennent dans la dissémination tumorale (**Figure 17**) [100]. L'implication de l'ANXA1 dans ces différents processus a été largement étudiée grâce à l'utilisation de cellules tumorales *in vitro* et de modèles murins *in vivo*. Cette partie va dans un premier temps rester générale, en faisant un état de l'art du rôle de l'ANXA1 dans différents cancers, puis se focaliser sur les deux pathologies qui ont été étudiées durant ces travaux de thèse : le **cancer du sein** et le **mélanome**.

1- Dérégulation de l'ANXA1 dans les cancers

1.1- Surexpression de l'ANXA1

L'analyse de biopsies de patients et de données cliniques a permis de montrer dans plusieurs cancers une surexpression de l'ANXA1 dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain (souvent adjacent). C'est notamment le cas pour : le cancer du pancréas [101], [102], du foie [103]–[105], de l'estomac [106], du poumon [107] ou encore pour le cancer colorectal [108]. Outre la simple analyse de l'expression ou du niveau protéique de l'ANXA1, des études se sont également intéressées à la corrélation de cette expression avec les caractéristiques clinico-pathologiques des tumeurs (différenciation, grade/stade, métastases, survie des patients). Le stade de différenciation de ces dernières semble par exemple être lié à l'expression de l'ANXA1, puisque dans le cancer du pancréas

et du foie cette protéine est plus fortement exprimée au niveau des tumeurs peu différenciées par rapport à celles qui sont bien différenciées [101], [105]. De plus, dans ces deux pathologies, la faible différenciation des tumeurs est associée à un pronostic plus défavorable [109], [110]. L'ANXA1 est donc préférentiellement exprimée au niveau des tumeurs les plus agressives. Dans les cancers de l'estomac [111], de la vessie [112] ou encore dans le glioblastome [113], l'expression de l'ANXA1 est plus forte au niveau des tumeurs de haut grade histologique c'est-à-dire des tumeurs à fort degré de malignité. Dans d'autres cancers (tête et cou [114], estomac [106], [115] et poumon [116]), l'expression de l'ANXA1 corrèle positivement avec l'apparition de métastases et semble donc être associée à la dissémination tumorale. L'implication de l'ANXA1 dans l'agressivité tumorale pose donc la question d'une éventuelle corrélation entre la présence de la protéine et la survie des patients. En effet, une forte expression de l'ANXA1 tumorale entraîne une diminution de la survie globale des patients dans les cancers du tractus digestif (œsophage [117], foie [104], estomac [111], [115]) mais également le cancer du poumon [116]. De façon globale, l'ANXA1 semble être sur-régulée dans certaines tumeurs, et il existe un lien entre cette sur-régulation et l'agressivité tumorale. Afin de confirmer ce lien, des études *in vitro* ont été menées dans le but d'étudier l'influence de l'ANXA1 sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales.

La surexpression de l'ANXA1 induite chez les cellules Eca109 (cancer de l'œsophage) et A549 (cancer du poumon) entraîne une stimulation de leur prolifération [118], [119]. L'extinction de l'expression de l'ANXA1 dans les cellules cancéreuses pancréatiques MIA-PaCa2 entraîne également une augmentation de la prolifération [120]. Contrairement aux cellules MIA-PaCa2, la diminution de l'expression de l'ANXA1 dans les cellules MKN45 (cancer estomac) n'influe pas sur leur prolifération [111]. L'effet de l'ANXA1 sur la prolifération semble donc être tissu-spécifique. En effet les données précédentes montrent qu'en fonction du type de cancer, l'ANXA1 peut stimuler, inhiber ou ne pas affecter la prolifération cellulaire. Les études de migration et d'invasion donnent quant à elles des résultats plus homogènes entre les différents types de cancers et s'accordent à dire que l'ANXA1 stimule ces deux processus. Au niveau des cellules de cancer du pancréas par exemple, la diminution de l'expression de l'ANXA1 est associée à une baisse des capacités migratoires et invasives des cellules contrairement au traitement avec le peptide Ac2-26 qui les stimule [120], [121]. L'utilisation d'un anticorps bloquant l'ANXA1 permet de limiter la migration et l'invasion des cellules de cancer du pancréas. De plus, des vésicules contenant de l'ANXA1, sécrétées par les cellules tumorales sont également capables de favoriser la migration et l'invasion cellulaire. Ces observations incriminent donc un effet plutôt extracellulaire de la protéine [121], [122]. De façon similaire, la diminution de l'expression de l'ANXA1 dans les cellules de cancer du poumon [116] et du foie [104] limite leur migration et leur invasion. A l'opposé, la surexpression de l'ANXA1 dans les cellules de cancer de

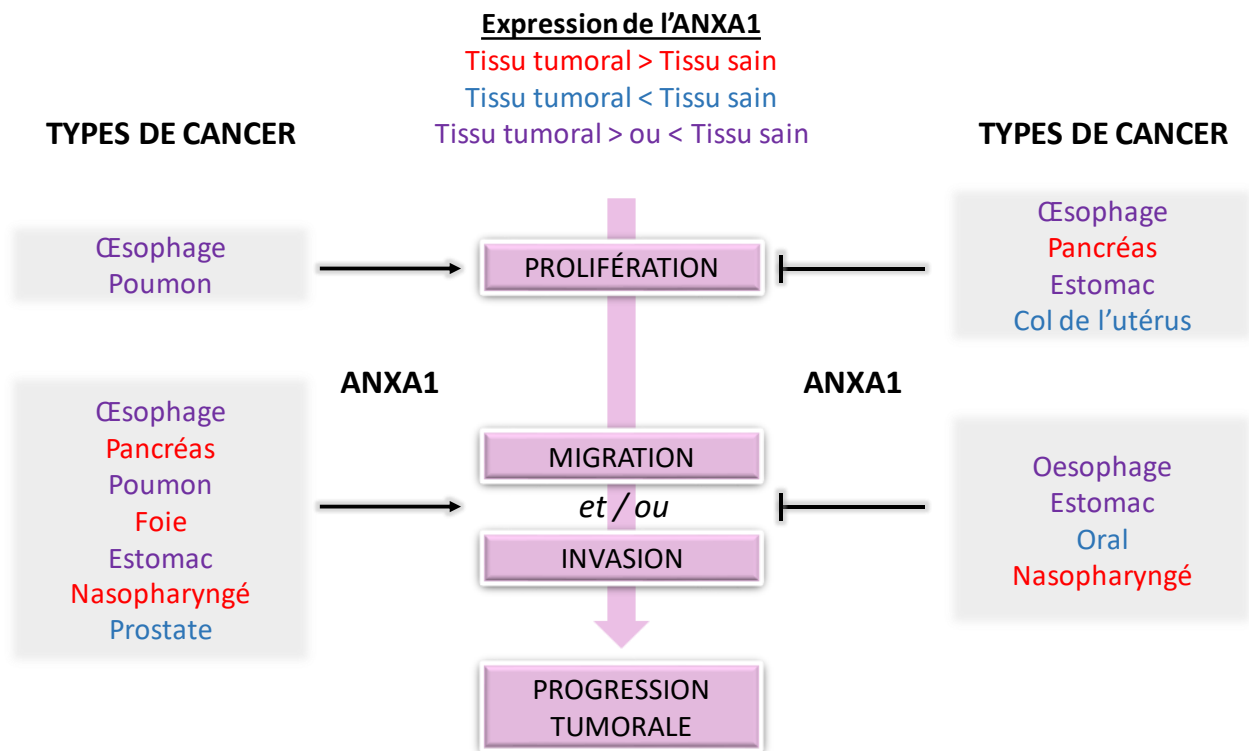


Figure 18 : L'annexine A1 module la progression tumorale dans différents types de cancer. L'ANXA1 est dérégulée dans de nombreux cancers. Elle est sur- ou sous-exprimée dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains en fonction du type de tumeur. De façon générale, lorsque l'ANXA1 est surexprimée, elle est associée à des effets stimulateurs sur la migration et l'invasion et présente donc un rôle oncogénique et inversement. Cependant ceci n'est pas vrai pour tous les types de cancers. L'ANXA1 stimule par exemple l'invasion des cellules de cancer de la prostate alors que dans ce type de cancer l'ANXA1 est sous-régulée par rapport au tissu sain. De plus, pour le cancer nasopharyngé, les données sont contradictoires. Pour certains cancers, au niveau desquels la sur- et la sous-expression ont été décrites, il est difficile de définir clairement le rôle de l'ANXA1 dans la progression tumorale. De plus, les effets de l'ANXA1 sur la prolifération ne sont pas toujours en adéquation avec les effets sur la migration et l'invasion. Par exemple dans le cancer du pancréas, l'ANXA1 inhibe la prolifération cellulaire mais stimule la migration et l'invasion. Il est donc difficile de définir un rôle pro ou anti-tumoral de l'ANXA1 dans les cancers en général.

l'œsophage, de l'estomac et des poumons est associée à une stimulation de ces deux processus [111], [118], [119]. Cependant, dans le cancer nasopharyngé, l'ANXA1 s'est à la fois montrée stimulatrice [114] et inhibitrice [123] de la migration et de l'invasion (**Figure 18**).

L'ensemble de ces données sous-entend que l'ANXA1 est surexprimée dans les tumeurs et que cette surexpression est associée à une augmentation de leur malignité et à la formation de métastases. L'ANXA1 est donc associée à des effets oncogéniques, particulièrement dû à la stimulation des phénomènes de migration et d'invasion *in vitro*. Ces données sont également confortées par des modèles murins, montrant que l'injection de cellules tumorales, dont l'expression de l'ANXA1 a été réduite considérablement, permet de diminuer la formation de métastases dans différents types de cancer [111], [114], [120]. Cependant d'autres études ont mis en évidence une sous-expression de l'ANXA1, pouvant être considérée comme protéine suppressive de tumeur. Ceci souligne donc des rôles probablement opposés de l'ANXA1 ainsi que la présence de données controversées pour certains types de cancers pour lesquels la surexpression et la sous-expression ont été rapportées.

1.2- Sous-expression de l'ANXA1

A la manière de la surexpression, la sous-expression de l'ANXA1 a été identifiée au niveau de tumeurs de patients présentant différents types de cancer. En effet, on retrouve une diminution de l'expression de l'ANXA1 dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains pour les cancers de type tête et cou [124]–[126], œsophage [127], [128], prostate [128], [129], estomac [130], poumon [131], col de l'utérus [132] ou encore le cancer de la thyroïde [133]. De plus, plusieurs études rapportent une expression plus importante de l'ANXA1 dans les tumeurs bien différenciées par rapport à celles qui le sont peu. C'est le cas pour le cancer de l'œsophage [127], [134], de l'estomac [130], [134], du col de l'utérus [132], de la thyroïde [133] ou encore le cancer tête et cou [124], [126]. Généralement, les tumeurs bien différenciées sont moins agressives et présentent un meilleur pronostic que les tumeurs indifférenciées [135]. De plus, l'ANXA1 est négativement corrélée au grade histologique dans les carcinomes oraux des cellules squameuses [125], et la perte de cette protéine est associée à la progression des tumeurs vers un phénotype plus malin pour les cancers de l'œsophage [128], de la prostate [129], de l'estomac [130] et du col de l'utérus [132]. En d'autres termes, plus l'expression de l'ANXA1 est faible plus la tumeur est agressive. Par exemple au niveau de la prostate, l'épithélium normal présente une forte expression de l'ANXA1, cette expression est diminuée dans les néoplasies

intra-épithéliales et encore plus faible au niveau des tumeurs invasives [129]. Pour le cancer de l'estomac, l'expression de l'ANXA1 diminue au cours de la progression du tissu sain à la tumeur primaire, puis aux métastases [130]. Tout comme la surexpression, la sous-expression de l'ANXA1 est également corrélée à la survie globale des patients. Il a été montré pour les cancers de l'estomac et du poumon que la faible expression de l'ANXA1 est associée à une diminution de la survie globale [130], [131].

La surexpression de l'ANXA1 dans les cellules de cancer de l'estomac AGS qui possèdent une faible expression basale de la protéine entraîne un arrêt de la prolifération. Le traitement des cellules de cancer du col de l'utérus HeLa avec le peptide Ac2-26 limite leur prolifération [132]. A l'inverse, la diminution de l'ANXA1 dans les cellules N87, qui présentent un taux basal important d'ANXA1, stimule la prolifération [134]. La diminution de miR196a, un microARN inhibiteur de l'ANXA1, dans les cellules EC109 de carcinome de l'œsophage entraîne une diminution de la prolifération [136]. Ces études supportent donc un rôle plutôt antiprolifératif de l'ANXA1. Les analyses portant sur les capacités migratoires et invasives des cellules tumorales montrent que l'ANXA1 limite ces dernières dans différents cancers [123], [134], [136], [137]. L'ensemble de ces études met en évidence un rôle protecteur de l'ANXA1 vis-à-vis de la progression tumorale. Cependant, dans le cancer de la prostate qui présente une sous-expression de l'ANXA1, le peptide Ac2-26 est capable de stimuler l'invasion cellulaire *in vitro* (**Figure 18**) [138].

L'ANXA1 est donc dérégulée dans un large spectre de cancers. Cette dérégulation est étroitement liée aux caractéristiques clinico-pathologiques et notamment à l'agressivité tumorale et à la survie des patients. Cette protéine constitue donc un potentiel outil diagnostique et pronostique pour de nombreux cancers, mais également thérapeutique. Cependant, le profil d'expression ainsi que le rôle de l'ANXA1 peuvent être opposés d'un type de cancer à un autre (**Annexe 1**). De plus, au sein d'un même cancer certaines études relatent une surexpression de l'ANXA1 associée à un rôle oncogénique et d'autres une sous-expression associée à un rôle protecteur. C'est le cas par exemple du cancer de l'œsophage, de l'estomac ou encore du poumon. Ces données controversées peuvent s'expliquer par le fait que les tumeurs d'un même tissu peuvent avoir des origines cellulaires différentes. Par exemple au niveau de l'œsophage, les adénocarcinomes semblent présenter une surexpression et les carcinomes des cellules squameuses plutôt une sous-expression. On observe également une sous-expression de l'ANXA1 dans le cancer du col de l'utérus [132] et le cancer tête et cou [126] développés à partir de cellules squameuses. L'hétérogénéité tumorale entre tumeurs d'un même tissu ou au sein d'une même tumeur peut également être un facteur de variabilité. En effet au sein d'un même type

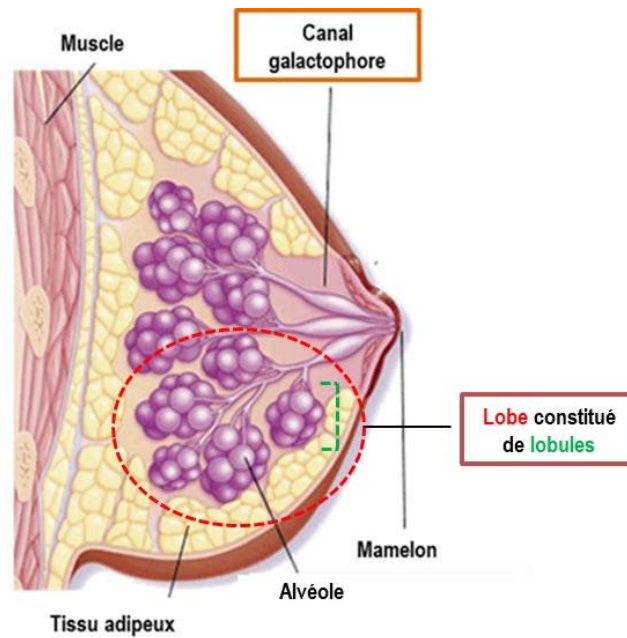


Figure 19 : Représentation schématique d'une coupe de sein. Le sein est constitué de la glande mammaire ainsi que de tissus conjonctifs et adipeux. La glande mammaire se compose de quinze à vingt lobes séparés par du tissu graisseux. Ces lobes sont formés de lobules capables de sécréter du lait en période d'allaitement qui sera conduit jusqu'au mamelon par les canaux galactophores. On distingue ainsi les cellules dites lobulaires et canalaire.

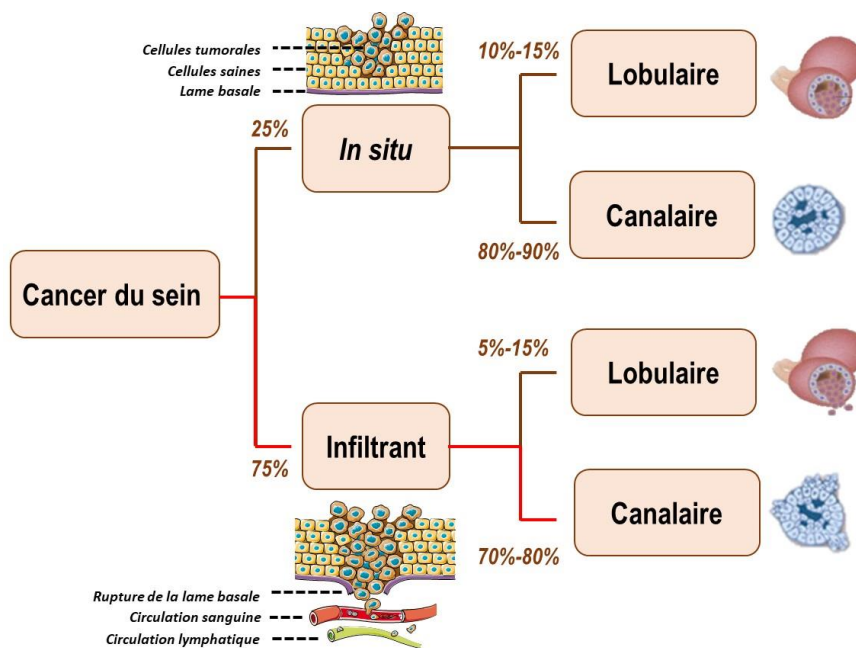


Figure 20 : Classification histologique des cancers du sein (CS). Les cancers du sein peuvent être *in situ* (25% des CS) c'est-à-dire que les cellules tumorales ne sont pas capables de franchir la lame basale et vont donc rester au niveau de leur tumeur primaire ou infiltrant/invasifs (75%). Dans ce dernier cas, les cellules cancéreuses peuvent franchir la lame basale et gagner les circulations sanguine et lymphatique afin de former des métastases. De plus, les tumeurs mammaires peuvent se développer à partir des cellules épithéliales des lobules ou des canaux galactophores formant ainsi des tumeurs dites lobulaires ou canalaire. Les cancers du sein sont le plus souvent des carcinomes infiltrant de type canalaire.

de cancer, il peut exister différents sous-types présentant des propriétés parfois très différentes (expression de récepteurs, mutations, réponse aux traitements...). C'est notamment le cas pour le cancer du sein (CS), pathologie pour laquelle la surexpression et la sous-expression ont été documentées [139]. De plus, lorsqu'on analyse l'expression de l'ANXA1 au niveau des tumeurs, on prend également en compte l'ANXA1 présente dans les cellules non tumorales comme les cellules du système immunitaire par exemple. La présence d'un infiltrat immunitaire plus ou moins important peut donc également influencer les résultats d'expression de l'ANXA1 au sein des différentes tumeurs.

2- Expression controversée de l'ANXA1 dans le cancer du sein

2.1- Épidémiologie du cancer du sein et classifications

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et représente donc un grave problème de santé publique à travers le monde. En 2018, 627 000 décès ont été recensés, faisant du cancer du sein la première cause de mortalité féminine par cancer au monde. En France, pour la même année, environ 56 000 nouveaux cas de cancer du sein et 13 000 décès ont été recensés [140]. Les progrès importants réalisés tant au niveau du dépistage que de la prise en charge de cette maladie augmentent considérablement les chances de survie des patientes. En effet, plus de 3 cancers du sein sur 4 sont actuellement guéris. Toutefois le cancer du sein est une pathologie très hétérogène avec des pronostics et des réponses aux traitements variés. Cette pathologie présente une forte diversité à la fois entre les patients et au sein même des tumeurs [139].

Devant cette diversité, une première classification histologique a été développée par l'organisation mondiale de la santé en 1968 puis revue en 1981 [141]. Cette classification repose sur l'observation que les carcinomes mammaires peuvent se développer à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores (carcinome canalaire) ou des lobules (carcinome lobulaire) et qu'ils peuvent être *in situ* (non invasifs) ou infiltrants (invasifs) (**Figure 19**). Tandis que les tumeurs *in situ* restent au niveau des canaux ou des lobules, les tumeurs infiltrantes sont capables de franchir la membrane basale et de se disséminer dans la circulation. Ainsi, cette classification définit quatre grands types histologiques de tumeurs mammaires : les carcinomes canaux ou lobulaires, *in situ* ou infiltrants, les plus fréquents étant les carcinomes canaux infiltrants (**Figure 20**) [142]. Cependant, cette

Tableau 4 : Les différents sous-types moléculaires de cancer du sein définis par Perou, Sorlie et leurs collaborateurs. Les quatre sous-types de cancer du sein peuvent se distinguer par l'expression des récepteurs aux œstrogènes (RO), à la progestérone (RP) et au facteur de croissance épidermique humain (HER2). Chaque sous-type est plus ou moins représenté au sein des cancers du sein. Les tumeurs triple négatives font partie du sous-type basal-like.

| Sous-types moléculaires | Profils d'expression | | | Pourcentage des cancers du sein |
|-------------------------|----------------------|-----|------|---------------------------------|
| | RO | RP | HER2 | |
| Luminal A | + | + | - | 50% |
| Luminal B | + | +/- | +/- | 10% - 20% |
| HER2 + | - | - | + | 10% - 15% |
| Basal | - | - | - | 15% - 20% |

classification histologique reste insuffisante même si elle a été complétée et précisée au fil des années (3^{ème} édition en 2003, 4^{ème} en 2012 et 5^{ème} en 2019). Elle apporte une valeur pronostique mais ne permet pas de prédire pleinement l'évolution des cancers du sein. De plus, elle ne représente pas toute l'hétérogénéité de cette pathologie et ne prédit pas la réponse thérapeutique des tumeurs.

Une seconde classification dite « moléculaire » a donc été proposée par Perou, Sorlie et leurs collaborateurs [143], [144]. Ils ont réalisé une étude transcriptomique sur des échantillons tumoraux et non tumoraux qui leur a permis de différencier quatre sous-groupes moléculaires. Ces sous-groupes peuvent être discriminés sur la base de l'expression des gènes codants pour les récepteurs à l'œstrogène (RO), à la progestérone (RP) et le récepteur au facteur de croissance épidermique humain (HER2). En effet, les tumeurs des sous-types luminal A et luminal B expriment les récepteurs hormonaux, celles du sous-type HER2+ se caractérisent par une surexpression du récepteur HER2 et pour finir les tumeurs basales n'expriment pas les récepteurs hormonaux et ne présentent pas de surexpression d'HER2 (**Tableau 4**) [145]. Le cancer du sein triple négatif (CSTN) est communément associé au sous-type basal. En effet, environ 70 à 80% des CSTN correspondent à ce sous-type [146], [147].

2.2- Le cancer du sein triple négatif (CSTN)

Le CSTN représente entre 15 et 20% des cancers du sein. Il touche préférentiellement des femmes jeunes (moins de 50 ans) d'origine latine, africaine ou afro-américaine. Ces tumeurs sont particulièrement agressives puisqu'elles possèdent un fort pouvoir métastatique (poumon, système nerveux central) et sont donc associées à des rechutes précoces et à une survie plus péjorative par rapport aux autres sous-types de CS. De plus, les CSTN sont souvent diagnostiqués à des stades déjà métastatiques [148]. Les tumeurs triple négatives (TN) sont très hétérogènes et peuvent notamment être subdivisées en six sous-groupes en fonction de leurs profils d'expression génique : « *basal-like 1 et 2* », « *immunomodulatory* », « *mesenchymal-like* », « *mesenchymal stem-like* » et « *luminal AR* » (AR, récepteur aux androgènes) [149]. Cette classification permet de mieux stratifier les tumeurs et ainsi de pouvoir les cibler et les prendre en charge plus spécifiquement.

Contrairement aux sous-types luminaux A et B qui peuvent être traités avec des hormonothérapies ou au sous-type HER2+ avec les thérapies ciblées anti-HER2, aucune thérapie ciblée n'est actuellement disponible pour le traitement du CSTN. Le traitement standard des CSTN reste donc la chimiothérapie à base d'anthracyclines et de taxanes. Cependant le traitement des formes

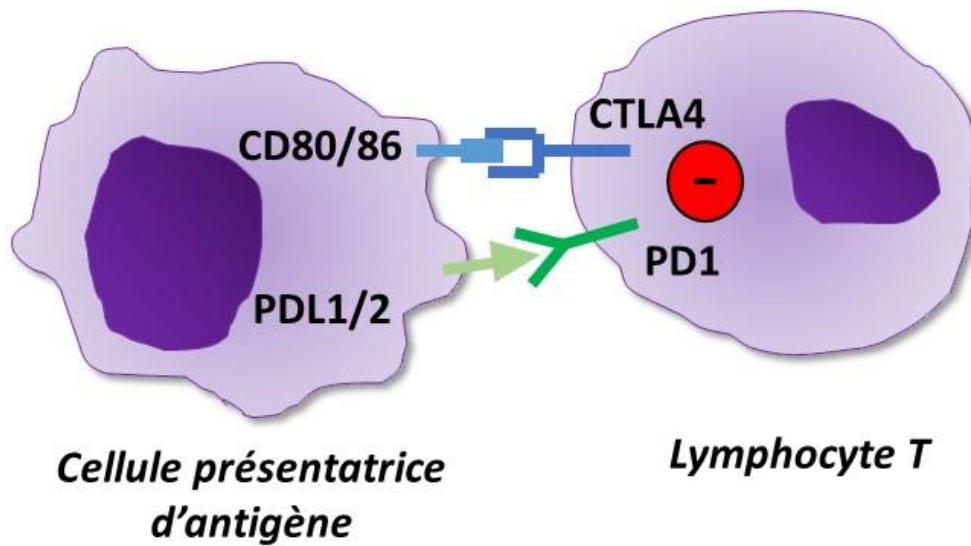


Figure 21 : Contrôle négatif des lymphocytes T par CTLA4 et PD1. L'interaction des protéines lymphocytaires CTLA4 et PD1 avec leurs ligands respectifs CD80/86 et PDL1/2 présents au niveau des cellules présentatrices d'antigènes permet de limiter la prolifération et l'activation des lymphocytes T.

métastatiques est associé à une médiane de survie de seulement 18 mois, voire inférieure [146], [150]. De nombreux travaux visent donc à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour ce sous-type très agressif. Parmi celles identifiées, certaines ont montré un intérêt thérapeutique notamment les inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP). Cette protéine joue un rôle majeur dans la réparation des cassures de l'ADN. Environ 14 à 20% des CSTN possède une mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* impliqués également dans la réparation de l'ADN. Le traitement de ces tumeurs avec un inhibiteur de PARP (olaparib) permet d'améliorer la survie sans progression des patientes de 4,2 à 7,2 mois [150]. Ces tumeurs sont également sensibles aux agents alkylants comme les sels de platine qui sont capables d'induire des cassures de l'ADN que les cellules tumorales mutées ne pourront pas réparer. Une autre piste thérapeutique dans le CSTN est l'utilisation de l'immunothérapie. Elle vise à stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale en inhibant les protéines impliquées dans les points de contrôle immunitaires. Les LT possèdent par exemple le récepteur PD1 (programme de mort cellulaire 1) dont les ligands PDL1 et PDL2 sont présents à la surface des CPAg. L'interaction des ligands avec PD1 inhibe la prolifération et l'activation des LT et limite ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale adaptative (**Figure 21**). Un essai clinique de phase 3 (IMpassion) a montré l'efficacité modérée de l'anti-PDL1 atezolizumab en combinaison avec le nab-paclitaxel dans le traitement des CSTN avancés. Les patientes traitées avec cette combinaison bénéficient d'une survie sans progression de 7,2 mois contre 5,5 mois pour les patients traités avec la chimiothérapie seule [150]. Malgré l'émergence de nouvelles pistes thérapeutiques, les patientes atteintes de CSTN ne bénéficient toujours pas à l'heure actuelle de thérapie ciblée. Il est donc primordial de poursuivre les études sur ce sous-type particulièrement agressif et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques mais également diagnostiques.

2.3- Dérégulation de l'expression de l'ANXA1 dans les cancers du sein

Plusieurs études se sont intéressées à l'expression de l'ANXA1 lors de la progression du cancer du sein, c'est-à-dire lors du passage du tissu normal à une tumeur bénigne (ex : hyperplasie, fibroadénome), à un carcinome *in situ* puis finalement à un carcinome invasif capable de former des métastases. Beaucoup de ces études s'accordent à dire que dans le tissu mammaire sain, l'ANXA1 est majoritairement voire exclusivement exprimée au niveau des cellules canalaire myoépithéliales [112], [151]–[155]. Les tumeurs bénignes présentent un profil d'expression similaire au tissu normal contrairement aux carcinomes *in situ* et invasifs qui expriment beaucoup moins l'ANXA1 [152]–[154], [156]. La variation de l'expression de cette dernière est observée dès le stade *in situ* des cancers du sein, on peut donc supposer que l'ANXA1 intervient dans les étapes précoces de la tumorigénèse.

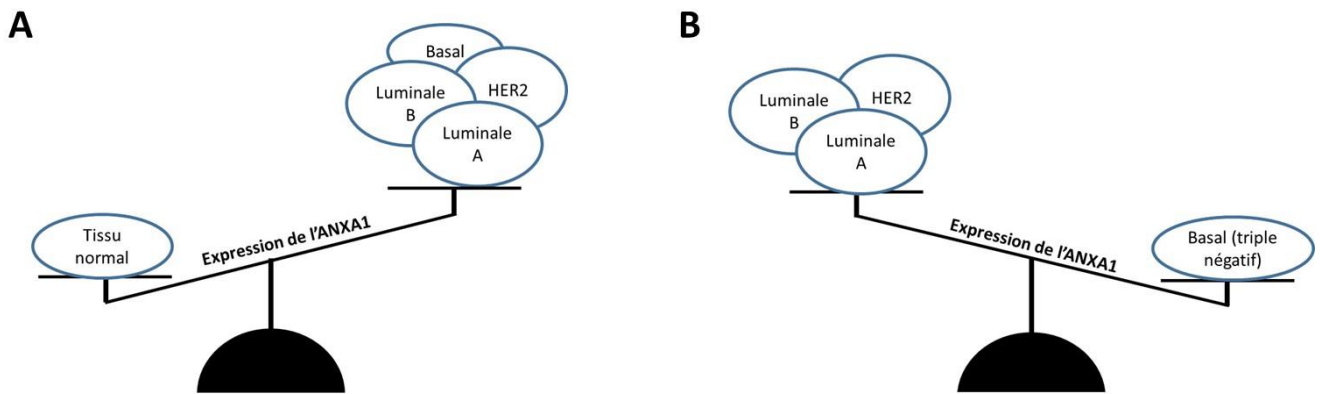


Figure 22 : Expression de l'annexine A1 dans le cancer du sein. Le cancer du sein est une pathologie très hétérogène pour laquelle différents sous-types moléculaires ont été déterminés. **(A)** Si on compare le tissu normal au tissu cancéreux, tout sous-types confondus, on obtient dans la grande majorité des cas une sous-expression de l'ANXA1 dans les tissus cancéreux. **(B)** Si on analyse les tumeurs triple négatives (sous-type basal), on observe une surexpression de l'ANXA1 par rapport aux autres sous-types.

Cependant, une étude plus ancienne a montré un plus fort marquage immuno-histologique de l'ANXA1 au niveau des cellules canalaire des carcinomes par rapport au tissu sain et aux tumeurs bénignes [155]. Ces données mettent donc en lumière la présence d'une controverse vis-à-vis de l'expression de l'ANXA1, même si la majorité des études tendent à observer une diminution de l'ANXA1 dans les carcinomes par rapport au tissu sain et aux tumeurs bénignes. Ce faible niveau de l'ANXA1 dans les tumeurs est associé à une diminution de la survie globale des patients (**Figure 22A**).

L'expression de l'ANXA1 a également été analysée dans les tumeurs primaires et leurs métastases associées. Cependant, des résultats très hétérogènes ont été obtenus. En 2010, Maschler et ses associés ont mis en évidence une perte de l'ANXA1 dans les tumeurs qui forment des métastases par rapport à celles qui n'en développent pas [157]. Certaines études montrent que l'expression de l'ANXA1 qu'elle soit faible [153] ou forte [155] est conservée entre la tumeur primaire et ses métastases ganglionnaires ou distantes. D'autres exposent un niveau plus élevé de l'ANXA1 dans les métastases ganglionnaires par rapport à leurs tumeurs primaires [112], [154]. Dans ce dernier cas, l'ANXA1 pourrait alors avoir un rôle différent dans les tumeurs primaires et les métastases. Il est donc difficile ici de déterminer un réel consensus sur l'expression et le rôle de l'ANXA1 dans le CS.

Certaines analyses de l'ANXA1 dans le cadre des cancers du sein se sont plutôt basées sur la prise en compte des différents sous-types moléculaires. En 2008, Cao et ses collaborateurs ont analysé 82 paires de carcinomes mammaires et leurs métastases ganglionnaires associées. Ils ont montré une perte de l'ANXA1 dans 79% des cas (tumeurs primaires et métastases) par rapport au tissu normal. Cependant dans 21% des cas, l'ANXA1 est bien exprimée dans les échantillons et cette présence plus importante de la protéine est associée à une triple négativité des tissus cancéreux [153]. L'analyse *in silico* de la base de données de séquençage ARN TCGA (« *The Cancer Genome Atlas* ») a permis de montrer que 62% des tumeurs TN ont une forte expression de l'ANXA1 alors que les tumeurs luminales n'expriment pas voire très peu l'ANXA1 et que 77% des tumeurs HER2 positives présentent un niveau faible d'ANXA1 [151]. L'analyse de tumeurs humaines et de lignées cellulaires a permis de clairement montrer que l'ANXA1 est surexprimée dans le sous-type moléculaire triple négatif par rapport aux autres à savoir les luminaux et les HER2 positifs (**Figure 22B**) [151], [158]–[161]. La forte expression de l'ANXA1 dans les cancers du sein en général est associée à un pronostic défavorable, avec une survie globale plus faible par rapport aux tumeurs présentant peu d'ANXA1 [162]. Au sein même du sous-type TN, l'importante présence de la protéine est associée à une diminution de la survie globale et de la survie sans rechute [152], [159], [161], [163]. De plus, dans l'ensemble des cancers du sein, qu'ils soient triple négatifs ou non, l'expression de l'ANXA1 est positivement corrélée aux mutations *BRCA1*

et *BRCA2* associées à des tumeurs de mauvais pronostic [162]. Globalement, l'expression de l'ANXA1 semble donc être impliquée dans l'agressivité des tumeurs mammaire. Comme pour les autres cancers, l'ANXA1 est capable de moduler différents processus impliqués dans le développement et la progression tumorale.

2.4- Rôle de l'ANXA1 dans le développement et la progression du cancer du sein

Du fait de l'importance d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le CSTN qui surexprime l'ANXA1, de nombreuses études se sont intéressées à mieux comprendre l'implication fonctionnelle de cette protéine dans ce type de tumeur mammaire. Des études de protéomique et phosphoprotéomique quantitative, réalisées sur des cellules épithéliales mammaires normales qui expriment l'ANXA1 ou dont l'expression a été réduite par le biais d'ARN interférents, ont permis de mettre en évidence l'implication de l'ANXA1 dans la réponse cellulaire vis-à-vis des dommages de l'ADN ou encore dans l'adhésion et la migration cellulaire. L'ANXA1 serait donc engagée à la fois au niveau de l'initiation et de la progression du cancer du sein [164], [165]. Un grand nombre d'études *in vitro* utilisant des lignées cellulaires humaines de cancer du sein ont permis d'analyser plus précisément le rôle de l'ANXA1 dans les processus de prolifération, migration et invasion. Parmi toutes les lignées cellulaires utilisées, les plus étudiées sont les cellules luminales MCF7 (faible expression de l'ANXA1) et la lignée TN MDA-MB-231 (forte expression de l'ANXA1).

2.4.1- Modulation de la prolifération cellulaire

L'ANXA1 a été décrite à la fois comme protéine stimulatrice et inhibitrice de la prolifération cellulaire. En 2016, Yuan et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de l'ANXA1 dans les cellules MCF7, qui présentent un niveau basal faible de cette protéine, entraîne une diminution de leur prolifération [166], [167]. A l'inverse la transfection de ces cellules avec un ARN interférent dirigé contre l'ANXA1 provoque une stimulation de cette dernière. De plus, les cellules MDA-MB-231 transfectées avec le petit ARN miR196a capable d'inhiber l'expression de l'ANXA1 permet de stimuler leur prolifération [166]. Ces résultats suggèrent donc un rôle antiprolifératif de l'ANXA1 comme déjà décrit dans d'autres cancers comme le cancer du pancréas [120] et de l'estomac [134]. Cependant, d'autres analyses sur ces mêmes lignées sont plutôt en faveur d'un rôle stimulateur de la prolifération

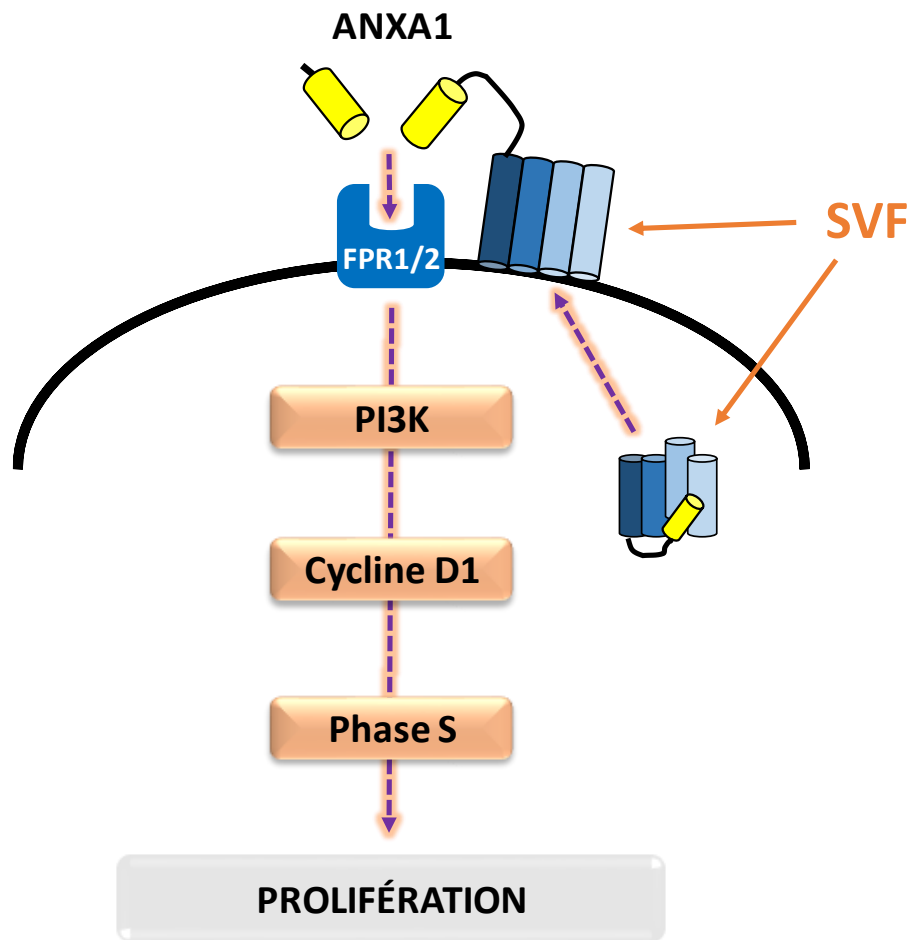


Figure 23 : Stimulation de la prolifération des cellules de cancer du sein par l'annexine A1. L'ANXA1 joue le rôle de médiateur des effets prolifératifs des agents mitogènes tel que le sérum de veau fœtal (SVF). La signalisation FPR, activée par ses agonistes tels que l'ANXA1 pleine longueur ou encore le peptide issu de son clivage entraîne également une stimulation de la prolifération. L'augmentation de la prolifération passe par la voie PI3K qui entraîne une augmentation de l'expression de la cycline D1, protéine impliquée dans le cycle cellulaire notamment la progression en phase réplivative (S).

comme dans le cancer du poumon [119]. En effet, la diminution de l'ANXA1 dans les cellules MCF7 et MDA-MB-231, transfectées avec un ARN interférent, atténue la prolifération cellulaire induite par le sérum de veau fœtal (SVF). Dans cette étude, la transfection des cellules avec l'ARN interférent dirigé contre l'ANXA1 n'a pas d'effet sur la prolifération en absence de signaux mitogènes. Les auteurs ont également montré que l'incubation des cellules MCF7 avec du SVF augmente l'ANXA1 cytosolique et membranaire. Ceci souligne donc un rôle probable de l'ANXA1 en tant que médiateur des signaux mitogènes tels que le SVF dans les cellules cancéreuses mammaires [168] (**Figure 23**).

Du point de vue mécanistique, la fonction proliférative de l'ANXA1 semble être portée en partie par sa localisation extracellulaire. Le peptide Ac2-26 ainsi que les autres agonistes des récepteurs FPR sont capables de stimuler la prolifération des cellules MCF7 et MDA-MB-231 *in vitro*. Cependant, cette stimulation n'est plus possible en absence des récepteurs FPR1 et FPR2. Des analyses complémentaires réalisées sur les cellules MCF7 ont montré que la transfection de ces dernières avec un ARN interférent dirigé contre l'ANXA1 atténue l'augmentation de la cycline D1 (protéine du cycle cellulaire) induite par le SVF. De plus, l'agoniste des FPR2, LXA4 (« *lipoxin A4* ») présente les mêmes effets stimulateurs que le SVF sur le niveau de cycline D1. Ces effets sont dépendants de la voie PI3K (« *phosphoinositide 3-kinase* ») [168]. Le rôle des récepteurs FPR dans la prolifération des cellules de cancer du sein a également été montré dans les cellules MDA-MB-231 grâce à l'utilisation de la cyclosporine A. Cet antagoniste des récepteurs FPR1 permet de limiter la prolifération des cellules et est associé à une diminution du nombre de cellules en phase répliative du cycle cellulaire (phase S) [169]. L'ensemble de ces données implique l'axe ANXA1/FPR dans la prolifération tumorale (**Figure 23**).

Pour aller plus loin, une étude récente s'est focalisée sur l'examen du clivage de l'ANXA1 au niveau des cellules tumorales mammaires. En effet, dans les cellules triples négatives MDA-MB-231, l'ANXA1 peut être clivée par la cathepsine D au niveau du résidu tryptophane 12 (forme clivée générée de 35,5 kDa). Cependant ce clivage n'est pas observé dans la lignée luminale MCF7. De plus, il existe une corrélation positive entre l'expression de l'ANXA1 et de cette enzyme dans les cellules MDA-MB-231. L'utilisation de la pepstatine A en tant qu'inhibiteur de la cathepsine D a permis de mettre en lumière l'importance du clivage de l'ANXA1 dans la prolifération cellulaire puisque cet inhibiteur limite la prolifération des MDA-MB-231 et stimule leur apoptose [170]. Il a également été montré que cette lignée cellulaire est capable de sécréter de l'ANXA1 dans le milieu environnant à la fois sous forme totale et clivée [169]. Ces données favorisent le rôle activateur de l'ANXA1 extracellulaire vis-à-vis de la prolifération des cellules tumorales mammaires notamment TN. Cette action passe très probablement par l'interaction du domaine Nter (protéine totale ou peptide issu du clivage) de la protéine avec les récepteurs FPR1 et FPR2.

2.4.2- Modulation de la migration et de l'invasion

Comme pour les autres types de cancers, les données concernant la migration et l'invasion sont, contrairement à la prolifération pour laquelle des contradictions existent, plutôt en accord. L'ANXA1 présente une action stimulatrice de ces deux processus comme dans les cancers du pancréas [120] et du foie [104] par exemple. Tout d'abord, la lignée MDA-MB-231 très invasive exprime fortement la protéine alors que les lignées luminales MCF7 et T47D peu, voire non invasives, expriment très peu voire pas du tout l'ANXA1. De plus, l'ANXA1 est capable de réguler positivement l'expression et l'activation de la métalloprotéase matricielle MMP9 impliquée dans la dégradation des matrices extracellulaires (MEC). Cette dégradation est indispensable à l'invasion cellulaire [171]. La diminution de l'expression de l'ANXA1 dans les cellules TN humaines MDA-MB-231, MDA-MB-436 et MDA-MB-468 par différentes méthodes (invalidation génique, ARN interférents) entraîne une diminution de leurs capacités migratoires et invasives [161], [167], [169], [171], [172]. D'autre part, la surexpression de l'ANXA1 stimule la migration des cellules luminales MCF7. A l'inverse la transfection de ces cellules avec un ARN interférent ciblant l'ANXA1 entraîne une diminution de leur capacité migratoire associée à une augmentation du nombre de points d'adhésion focaux. Ces effets sont dépendants de la signalisation ERK [167]. La diminution de l'expression de l'ANXA1 dans la lignée tumorale murine 168FARN est associée à une diminution de l'invasion cellulaire [173]. De façon intéressante, dans les cellules mammaires normales, l'invalidation génique de l'*Anxa1* entraîne une diminution de la migration même dans un contexte non tumoral [165].

Comme pour la prolifération, l'ANXA1 extracellulaire semble jouer un rôle important dans les processus de migration et d'invasion puisque le traitement des cellules MDA-MB-231 avec le peptide Ac2-26 est capable de stimuler ces processus. A nouveau, l'action extracellulaire de la protéine passe très probablement par les récepteurs FPR notamment FPR1. En effet, le blocage des récepteurs FPR1 avec un antagoniste diminue la migration et l'invasion cellulaire [169]. L'implication de l'axe ANXA1/FPR a également été rapporté dans d'autres types de cancer dont le cancer du pancréas [121] et de la prostate [138]. Le rôle du clivage de l'ANXA1 dans la migration et l'invasion a également été étudié. Le traitement des cellules MDA-MB-231 avec de la pepstatine A, qui inhibe le clivage de l'ANXA1 par la cathepsine D, limite ces deux processus [170]. L'implication des FPR et de l'ANXA1 dans l'agressivité tumorale a également été rapportée *in vivo*. Le traitement de souris porteuses de tumeurs MDA-MB-231 avec un antagoniste des FPR1 (injection intra-péritonéale) entraîne une diminution du volume tumoral ainsi que du développement des métastases par rapport aux souris contrôles [169]. L'injection intracardiaque de souris athymiques avec des cellules MCF7 qui surexpriment l'ANXA1 entraîne une augmentation de leur potentiel métastatique associée à une diminution de la survie.

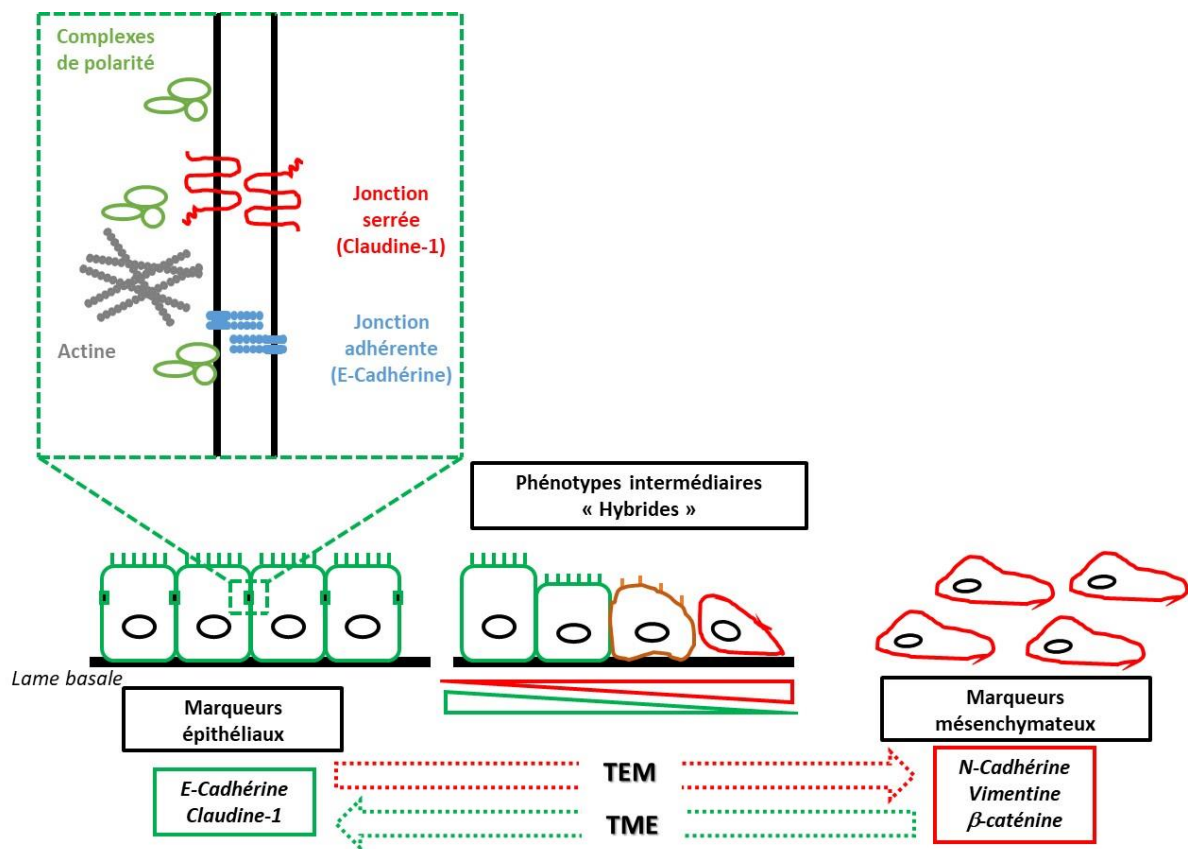


Figure 24 : Principales modifications cellulaires de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

Contrairement aux cellules mésenchymateuses, les cellules épithéliales sont intimement jointes entre elles par des structures membranaires spécialisées : les jonctions cellulaires. Elles sont caractérisées par une polarité apico-basale et reposent sur une lame basale. Lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), les cellules épithéliales vont progressivement subir des changements à la fois morphologiques, architecturaux et fonctionnels. La première étape est le désassemblage des jonctions notamment des jonctions serrées (claudine-1) et adhérentes (E-cadhérine) et la perte de la polarité. L'expression des gènes épithéliaux est réprimée alors que celle des gènes mésenchymateux est activée. Les cellules vont ensuite réorganiser leur cytosquelette notamment suite à l'activation de l'expression de la vimentine et l'apparition de fibres de stress d'actine. Les cellules acquièrent une morphologie fibroblastoïde et des capacités migratoires et invasives. Le processus de TEM n'est pas toujours total, certaines cellules ne subissent qu'une TEM partielle et conservent une partie de leurs caractéristiques épithéliales : on parle dans ce cas de phénotype intermédiaire ou hybride. De plus, le mécanisme inverse à la TEM qu'est la transition mésenchymo-épithéliale ou TME permet aux cellules de retrouver leur phénotype épithélial.

Cependant, l'injection orthotopique de cette même lignée n'induit pas de différence au niveau de la croissance tumorale [174]. De plus, l'injection orthotopique de cellules cancéreuses murines 4T1, transfectées ou non avec des ARN interférents dirigés contre l'ANXA1, ne montre pas de différence au niveau des volumes tumoraux. Par contre, les souris porteuses de tumeurs issues des cellules dont l'expression de l'ANXA1 a été diminuée présentent moins de métastases que celles dont les cellules tumorales expriment l'ANXA1. L'ANXA1 tumorale semble donc être plutôt impliquée dans la dissémination des tumeurs mammaires [175].

2.4.3- Modulation de la transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM est un processus de trans-différenciation cellulaire dynamique et réversible qui permet d'engendrer des cellules de phénotype mésenchymateux à partir d'un épithélium structuré. Les cellules épithéliales qui reposent sur une lame basale sont étroitement liées entre elles par des jonctions cellulaires hautement spécialisées présentes au niveau apical. D'une part les jonctions serrées composées de protéines telles que les claudine-1 et les jonctions adhérentes composées principalement d'E-cadhérine d'autre part (**Figure 24**) [176]. Ces caractéristiques offrent aux cellules épithéliales une polarité apico-basale. L'architecture mésenchymateuse, quant à elle, s'oppose à l'organisation épithéliale. En effet, les cellules mésenchymateuses ne reposent pas sur une lame basale et ne présentent pas de polarisation apico-basale ni de jonctions cellulaires. De plus, une des particularités des cellules mésenchymateuses est la plasticité, qui leur offre des capacités migratoires et invasives. La TEM se traduit donc par des changements à la fois architecturaux et fonctionnels. Même s'il existe une certaine variabilité en fonction des types cellulaires et du contexte tissulaire, la TEM suit un programme précis et conservé, régulé par différents facteurs de transcription tels que Twist, Snail ou encore Zeb [177]. Ce programme passe par la perte des protéines jonctionnelles (claudine-1, E-cadhérine) contrebalancée par l'augmentation de l'expression de protéines mésenchymateuses comme la N-cadhérine, la dépolarisation des cellules épithéliales et l'acquisition de capacités migratoires et invasives. Durant la TEM, une réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules ainsi qu'un changement de composition des filaments intermédiaires qui s'enrichissent en vimentine sont également observés [176], [178]. Toutefois, la TEM ne répond pas à la loi du tout ou rien selon laquelle la cellule perd tous ses marqueurs épithéliaux et acquiert entièrement un phénotype mésenchymateux. En réalité, les cellules vont obtenir progressivement des traits mésenchymateux mais rarement perdre l'intégralité de leurs caractéristiques épithéliales préexistantes. Ceci donne lieu à des phénotypes intermédiaires

appelés « hybrides » (**Figure 24**) [179]. Depuis les années 2000, la TEM a été beaucoup étudiée dans les cancers au vu de son implication dans l'acquisition par les cellules tumorales d'un phénotype agressif et donc dans le développement de métastases [177], [179]. Plusieurs études ont montré que l'ANXA1 peut être stimulatrice [118], [137], [138] ou inhibitrice [120], [123] de ce processus en fonction des cancers. Des travaux ont permis de mettre en évidence le lien entre l'ANXA1 et la TEM dans le cancer du sein. Le TGF β (« *transforming growth factor β* ») est capable de stimuler la signalisation SMAD dans les cellules MDA-MB-231 (phosphorylation de SMAD2 et translocation nucléaire de SMAD4). Cependant, cette stimulation est atténuée lorsque l'expression de l'ANXA1 est diminuée grâce à des ARN interférents. De plus, les tumeurs primaires développées à partir des cellules dont l'expression de l'ANXA1 a été réduite possèdent également une réduction de la signalisation TGF β /SMAD impliquée dans le TEM [175]. L'ANXA1 semble donc être un médiateur des effets du TGF β sur les cellules cancéreuses TN *in vitro* et *in vivo* [175]. De plus, l'expression de l'ANXA1 corrèle positivement avec la vimentine et négativement avec la E-cadhérine dans les cellules épithéliales TN BT-549 et MDA-MB-231 [158].

L'expression de l'ANXA1 dans le cancer du sein reste controversée. En effet si on regarde les cancers du sein en prenant en compte les sous-types histologiques on se rend compte que dans la grande majorité des cas l'ANXA1 est sous-exprimée dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux. Par contre si on compare les sous-types moléculaires entre eux, on remarque une surexpression de la protéine dans les tumeurs TN par rapport aux autres sous-types. Ce sous-type étant minoritaire, il n'est pas étonnant que sa forte expression de l'ANXA1 soit masquée lorsqu'on regarde les cancers du sein en globalité. Une controverse est également présente en ce qui concerne l'implication de l'ANXA1 dans la prolifération cellulaire. En effet, l'ANXA1 est capable d'inhiber et de stimuler ce processus. L'effet prolifératif est associé à la présence extracellulaire de la protéine et à son interaction avec les récepteurs de la famille des FPR. Ceci laisse donc penser que l'ANXA1 intracellulaire pourrait être quant à elle plutôt responsable d'une activité antiproliférative basale de la protéine. L'ajout de signaux mitogènes permet de stimuler l'externalisation de l'ANXA1 à la membrane et ainsi favoriser son action proliférative. De plus, l'ANXA1 est également capable de stimuler les processus de migration et d'invasion. L'ensemble de ces données encourage donc l'analyse plus poussée de l'ANXA1 dans les cancers du sein, notamment pour le sous-type TN, associé à un mauvais pronostic et à une absence de thérapie ciblée. Il serait également intéressant de mieux comprendre l'implication de l'ANXA1 intracellulaire et extracellulaire dans la progression tumorale.

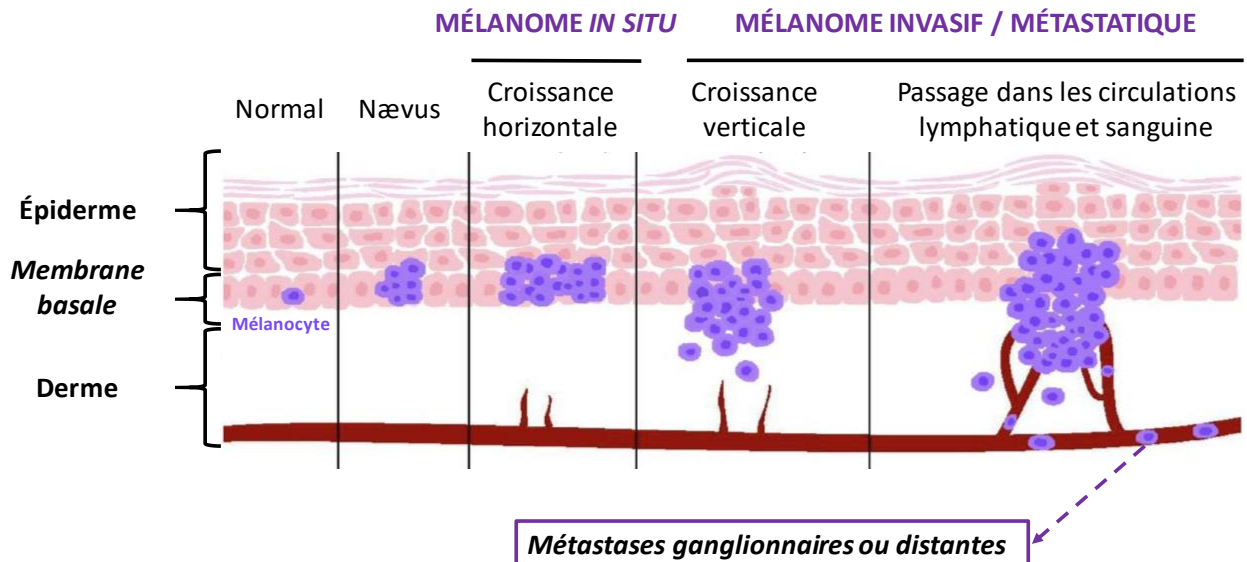


Figure 25 : Étapes de la croissance tumorale du mélanome. Le mélanome se développe à partir des mélanocytes de la peau située au niveau de la couche basale de l'épiderme. Le nævus, plus communément appelé grain de beauté, est en grande majorité bénin mais peut dégénérer en tumeur. Le mélanome possède deux stades de croissance. La croissance horizontale se définit par le développement des cellules cancéreuses au niveau de l'épiderme (mélanome *in situ*). La croissance verticale correspond quant à elle au développement des cellules en direction du derme et est associée à une rupture de la membrane basale et au passage à un phénotype invasif. Les cellules tumorales peuvent ensuite gagner les circulations sanguine et lymphatique afin de former des métastases locales (ganglionnaires ou cutanées) ou distantes au niveau d'autres organes. On parle alors de mélanomes métastatiques.

Adapté de Qendro et al, 2014 [182]

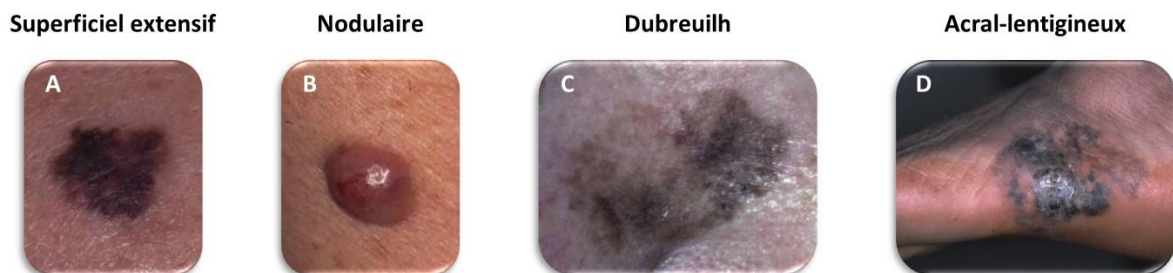


Figure 26 : Les différents types de mélanome. Il existe quatre grands types de mélanome. (A) Le mélanome de type superficiel extensif est le plus répandu. Il présente une évolution lente et est associé à l'accumulation de coups de soleil. (B) Le mélanome nodulaire est quant à lui le plus agressif puisqu'il possède une croissance verticale très rapide. (C) Le mélanome de Dubreuilh, également appelé lentigo, touche majoritairement des sujets âgés et apparaît au niveau des zones cutanées exposées au soleil. (D) Le mélanome acral-lentigineux se retrouve au niveau des extrémités comme par exemple les mains ou encore les pieds.

D'après Basset-Seguin & Beylot-Barry, 2020 [186]

3- Dérégulation de l'ANXA1 dans le mélanome

3.1- Épidémiologie et développement du mélanome

Le mélanome est une tumeur maligne qui se développe à partir des mélanocytes. Ces cellules sont localisées au niveau de la couche basale de l'épiderme et sont capables de produire le pigment donnant sa couleur à la peau : la mélanine. Le mélanome est la forme la plus rare mais la plus meurtrière des cancers de la peau (environ 4 à 10% des cancers de la peau et 80% des décès) [180], [181]. En 2018, environ 14 600 nouveaux cas de mélanome et 2 249 décès ont été recensés en France. De plus, l'incidence de ce type de cancer ne cesse d'augmenter [140]. Dans la grande majorité des cas, le mélanome se développe à partir d'une peau saine et dans 20% des cas, à partir d'un grain de beauté ou nævus déjà présent [180].

Les mélanocytes tumoraux vont suivre deux phases de croissance : la croissance horizontale et la croissance verticale. La phase horizontale correspond au développement des cellules au sein de l'épiderme. La croissance verticale, quant à elle, est définie par la progression de la tumeur en profondeur, qui franchit la lame basale et atteint le derme. On passe alors d'une tumeur dite *in situ* associée à un faible risque métastatique à une tumeur invasive. Les cellules tumorales vont alors pouvoir atteindre les circulations sanguine et lymphatique afin de former des métastases locales (ganglionnaires/cutanées) ou distantes au niveau d'autres organes comme les poumons par exemple (**Figure 25**) [182]. Au stade localisé, la survie relative à 5 ans est de 98%, elle chute à 62% avec la présence d'extensions loco-régionales et à 15% au stade métastatique. On comprend donc bien la nécessité de pouvoir réaliser des diagnostics précoces. En effet, s'il est détecté assez tôt, le mélanome est de bon pronostic et l'exérèse chirurgicale est préconisée [180], [183].

Il existe quatre grands types de mélanome. Le mélanome superficiel extensif est le plus répandu (60 à 70% des cas). Son évolution est assez lente et il est lié à l'accumulation de coups de soleil. Son évolution s'accélère après les 5 premières années. Le mélanome de Dubreuilh ou lentigo, représente 5 à 15% des cas. Il touche principalement des sujets âgés et apparaît au niveau des zones exposées au soleil. Le mélanome nodulaire (5 à 20% des cas) est le plus agressif puisqu'il possède une croissance très rapide en phase verticale. Pour finir, le mélanome acral-lentigineux également appelé mélanome des extrémités se présente comme son nom l'indique au niveau des mains, des pieds ou des ongles (<5% des cas) (**Figure 26**) [180], [184]–[186].

3.2- Les traitements du mélanome

Les approches thérapeutiques pour le mélanome sont diverses : exérèse chirurgicale, chimiothérapie (dacarbazine), thérapies ciblées (inhibiteur BRAF, MEK...), radiothérapie ou encore immunothérapie (anti-CTLA4, anti-PD1). Si pour les stades les plus précoces l'exérèse chirurgicale est recommandée, la prise en charge des stades plus avancés du mélanome et notamment du mélanome métastatique est plus complexe. La chirurgie doit donc être associée avec une radiothérapie ou chimiothérapie adjuvante [181]. La chimiothérapie seule reste peu efficace puisque seulement 15% des patients porteurs de tumeurs métastatiques sont répondeurs. Les thérapies ciblées sont mises en échec par des mécanismes de résistance et par l'apparition d'effets secondaires [187]. De plus, les mélanomes sont considérés comme des tumeurs relativement résistantes à la radiothérapie [181]. Cette radiorésistance peut être expliquée par différents mécanismes. Les irradiations induisent des dommages de l'ADN, notamment des cassures double-brins. En réponse à ces dommages, la protéine p53, impliquée dans la protection du génome, va être activée et va coordonner l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose des cellules irradiées. Cette protéine joue donc un rôle clé dans la radiosensibilité et est mutée dans la moitié des tumeurs [188]. Même si p53 ne présente pas de mutation dans 80 à 95% des mélanomes, son action est fortement limitée par ses inhibiteurs comme par exemple la protéine MDMX (« murine double minute X ») qui est surexprimée dans environ 68% des mélanomes. Cette atténuation de p53 est nécessaire au développement tumoral et peut également favoriser la radiorésistance [189]. La mélanine crée également une barrière radioprotective vis-à-vis des irradiations notamment en piégeant les électrons et les radicaux libres générés par la radiolyse de l'eau [190].

L'arrivée des immunothérapies a permis d'améliorer la survie des patients présentant des mélanomes métastatiques. Les anticorps anti-CTLA4 (« *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* ») tels que l'ipilimumab et anti-PD1 comme le nivolumab ou encore le pembrolizumab ont montré leur bénéfice dans le traitement du mélanome métastatique. La glycoprotéine CTLA4 est présente à la surface des LT. Lorsqu'elle se lie aux protéines CD80/86 présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes, ceci inhibe l'activation des LT (**Figure 21**). Une étude de phase 3 a permis de mettre en évidence l'efficacité de la combinaison de l'ipilimumab et de la dacarbazine par rapport à la dacarbazine seule. La médiane de survie globale était de 11,2 mois chez les patients ayant reçu la combinaison thérapeutique contre 9,1 mois chez ceux traités avec la dacarbazine seule [191]. Le taux de survie à 5 ans était également plus élevé chez les patients recevant l'ipilimumab combiné à la dacarbazine (18% vs. 8,8%) [192]. Pour les anti-PD1, une étude de phase 3 (CHECKMATE-066) a permis de montrer chez des patients présentant des mélanomes métastatiques non mutés pour le gène *BRAF*,

le bénéfice du traitement avec le nivolumab par rapport à la dacarbazine. En effet, le taux de survie global des patients traités avec le nivolumab était de 72,9% contre 42,1% pour ceux traités avec la chimiothérapie, et la médiane de survie sans progression est plus longue suite au traitement avec le nivolumab (5,1 mois vs. 2,2 mois) [193]. Le pembrolizumab possède quant à lui une efficacité thérapeutique supérieure à l'ipilimumab. En effet, la médiane de survie globale était de 32,7 mois chez les patients recevant le pembrolizumab contre 15,9 mois pour l'ipilimumab et la médiane de survie sans progression était respectivement de 8,4 mois et 3,4 mois (étude KEYNOTE-006) [194]. Malgré leur efficacité, ces thérapies visant à restaurer la réponse immunitaire sont associées à des effets secondaires auto-immuns. Le plus commun est le développement d'éruptions cutanées au niveau du tronc et des extrémités [187].

A l'heure actuelle, plusieurs possibilités thérapeutiques sont disponibles pour le traitement du mélanome. Malheureusement, l'utilisation de ces thérapies est limitée par le développement d'effets secondaires, de résistance aux traitements ou encore de l'existence de patients non répondeurs. Malgré d'importants progrès, le mélanome métastatique reste associé à un pronostic défavorable. Il est donc important d'identifier de nouveaux biomarqueurs à la fois diagnostiques, afin de pouvoir détecter les lésions de façon précoce, et également thérapeutiques. L'ANXA1 est une protéine d'intérêt dans de nombreux cancers au vu de sa dérégulation et de son implication dans le développement et l'agressivité tumorale. Plusieurs études, majoritairement réalisées par le laboratoire, ont donc visé à évaluer l'implication de l'ANXA1 dans le mélanome, notamment les formes agressives.

3.3- Implication de l'ANXA1 dans l'agressivité du mélanome

La présence de l'ANXA1 au niveau des cellules de mélanome a été pour la première fois mise en évidence en 1993 par Hall et ses collaborateurs dans la lignée A375 dérivant d'un mélanome malin [195]. Plus récemment, des études ont permis de mettre en avant une surexpression de l'ANXA1 dans les lignées cellulaires tumorales par rapport aux mélanocytes [196], [197]. Une analyse sur 61 biopsies de tumeurs primaires a permis de montrer par immunohistochimie la présence d'ANXA1 au niveau des mélanocytes tumoraux. De plus, l'augmentation de l'expression de cette protéine dans les tumeurs primaires est associée à une diminution de la survie sans métastases supposant ainsi une implication de l'ANXA1 dans l'agressivité tumorale [196]. Cette hypothèse est soutenue par des études réalisées à

l'aide de lignées cellulaires plus ou moins agressives *in vitro* et *in vivo*. Les cellules humaines SK-MEL-5 peu invasives, A2058 moyennement invasives et A375 très invasives présentent respectivement un niveau nul, intermédiaire et fort d'ANXA1 [198]. De plus, la lignée murine B16Bl6 capable de former des métastases *in vivo* exprime plus d'ANXA1 que la lignée B16F10 non métastatique dont elle dérive, *in vitro* et *in vivo* [199].

La transfection de cellules tumorales humaines [198] et murines [199] avec des ARN interférents ciblant l'ANXA1 permet de diminuer son expression et ainsi de diminuer les capacités invasives des cellules *in vitro*. Une étude *in vivo* réalisée sur des souris C57Bl6 porteuses d'une tumeur sous-cutanée B16Bl6 a permis de confirmer l'influence de l'ANXA1 tumorale sur l'invasion *in vivo*. En effet, l'injection intra-tumorale des ARN interférents dirigés contre l'ANXA1 entraîne une diminution de la formation de métastases pulmonaires [196]. L'ANXA1 tumorale est donc bien impliquée dans l'invasion *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs données laissent également penser que l'ANXA1 sous sa forme extracellulaire pourrait être stimulatrice de l'invasion via son action déjà décrite dans d'autres cancers sur les récepteurs FPR. Effectivement, le traitement des cellules humaines M3Dau, A375 et WM1552c avec le peptide Ac2-26 ou l'agoniste des récepteurs FPR : fMLP (N-formyl-L-méthionyl-L-leucyl-phenylalanine) permet d'augmenter significativement leur invasion. Cependant cet effet stimulateur est abrogé lors de l'ajout de l'antagoniste des récepteurs FPR1 et FPR2 : tBoc (*tert*-butoxycarbonyl) [196]. L'invasion des cellules murines B16Bl6 est également stimulée par fMLP et inhibée par tBoc. D'autres données suggèrent également une action plutôt extracellulaire de l'ANXA1 tumorale sur l'invasion.

Dans un premier temps la présence des récepteurs FPR a été relatée au niveau des mélanomes. Une analyse immunohistochimique des récepteurs FPR1 et FPR2 au niveau de nævus bénin et de mélanomes malins et métastatiques a montré une tendance des mélanomes à présenter plus de marquage par rapport à la forme bénigne. De plus la surexpression des FPR au niveau des mélanomes primitifs corrèle avec le caractère agressif des tumeurs et une survie plus péjorative [200]. Une étude récente a également mis en lumière l'importance de la localisation de l'ANXA1 dans l'agressivité tumorale. En effet, la localisation membranaire (et nucléaire) de l'ANXA1 dans les mélanomes fins (épaisseur $\leq 1,0$ mm) de bon pronostic (seul 2% ont des métastases), est associée à une augmentation de l'apparition des métastases [201]. Boudhraa et ses collaborateurs ont montré qu'à la manière de l'ANXA1, les récepteurs FPR1 et FPR2 sont plus exprimés dans les lignées de mélanome par rapport aux mélanocytes. En plus de la présence de ces récepteurs, l'ANXA1 extracellulaire a également été mise en évidence au niveau du mélanome. Certaines lignées cellulaires sont capables de sécréter de l'ANXA1. C'est particulièrement le cas de la lignée A375 [196]. Cette dernière présente également de l'ANXA1 au niveau de sa membrane externe. Comme pour le cancer du sein, l'ANXA1 extracellulaire est présente à la fois sous sa forme totale et clivée (clivage supposé en Ser²⁸ par une sérine protéase).

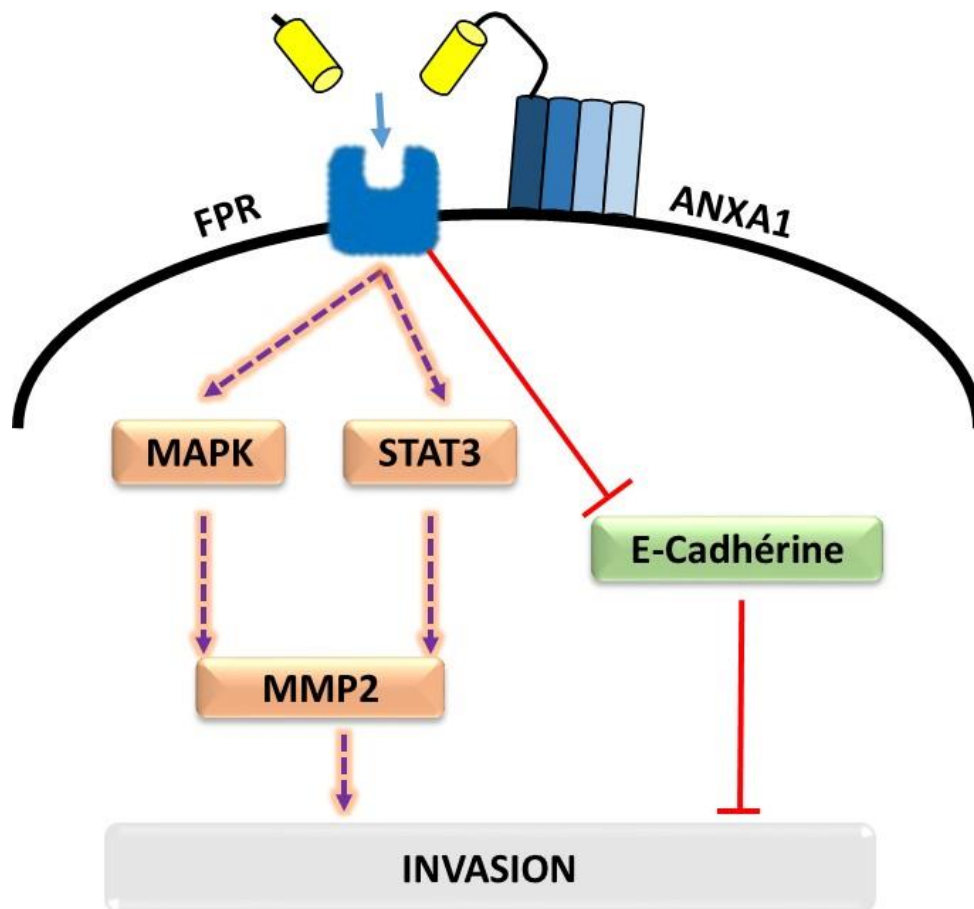


Figure 27 : Effet de l'annexine A1 sur l'invasion du mélanome. L'ANXA1 extracellulaire est capable de moduler positivement l'invasion par différents mécanismes par le biais de sa liaison aux récepteurs FPR. Elle stimule l'invasion en activant les voies de signalisation de type MAPK et STAT3 capables d'augmenter l'activation de la métalloprotéase MMP2. Cette dernière est impliquée dans la dégradation des matrices extracellulaires, étape importante pour l'invasion. L'ANXA1 est également capable de réguler négativement la E-cadhérine, protéine présente au niveau des jonctions cellulaires qui s'oppose donc au processus invasif.

La forme tronquée de la protéine corrèle positivement avec le nombre de cellules invasives [202]. De façon globale le système d'externalisation de l'ANXA1 n'est pas bien compris que ce soit dans le cadre de l'immunité ou de la cancérologie. Cependant une étude de 2012 permet de penser qu'une externalisation par le biais des exosomes (petites vésicules membranaires) pourrait être plausible. La lignée A375 sécrète par exemple plus d'exosomes que les mélanocytes, et ces derniers sont enrichis en ANXA1 [203].

L'action de l'ANXA1 sur l'invasion cellulaire peut s'expliquer par son influence positive sur la TEM et sur la régulation de l'activité de la métalloprotéase MMP2 impliquée dans la dégradation des matrices, étape indispensable à l'invasion. Par exemple, l'expression de l'ANXA1 dans différentes lignées de mélanome corrèle négativement avec l'expression de l'E-cadhérine (protéine impliquée dans les jonctions cellulaires) et l'ANXA1 est capable d'inhiber l'activité de son promoteur [198]. Par ailleurs, les agonistes FPR comme les peptides Ac2-26 et fMLP sont capables de stimuler l'activité MMP2 dans plusieurs lignées cellulaires de mélanome (dont les A375) contrairement à l'antagoniste tBoc [196]. Cet effet stimulateur passe par les signalisations cellulaires MAPK et STAT3 (« *Signal transducer and activator of transcription 3* ») (**Figure 27**) [202].

De façon générale, même si le nombre d'études sur l'ANXA1 et le mélanome est bien plus faible que pour le cancer du sein par exemple, l'implication de cette protéine (notamment sa forme extracellulaire) dans l'agressivité tumorale et notamment dans le processus d'invasion est claire. Cependant des études supplémentaires *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires afin de mieux comprendre l'implication de l'ANXA1 dans d'autres processus tels que la prolifération et la migration cellulaire par exemple et également l'influence de la localisation.

PARTIE 3 : IMPLICATION DE L'ANNEXINE A1 DANS LA MODULATION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

Le microenvironnement tumoral (MET), également appelé stroma, correspond à l'environnement dans lequel évoluent les cellules cancéreuses. Il se compose de différentes structures comme les vaisseaux sanguins et la matrice extracellulaire, mais également de différents types cellulaires (cellules stromales) comme les cellules immunitaires, les cellules endothéliales ou encore les fibroblastes. C'est une entité dynamique dont la composition évolue au fur et à mesure de la tumorigenèse [204]. En effet, le MET est un acteur crucial au sein des tumeurs puisqu'il est capable d'agir à la fois sur leur développement (initiation, survie, croissance) et sur leur progression/dissémination (migration, invasion, métastases) [204], [205]. Si pendant de nombreuses années la plupart des travaux en oncologie ont portés sur les cellules cancéreuses, depuis les années 2000, le nombre d'études concernant le MET a augmenté de façon exponentielle. Cette augmentation peut s'expliquer par l'intérêt croissant du rôle du ciblage de ce microenvironnement dans le développement de nouvelles thérapies, particulièrement le microenvironnement immunitaire (**Figure 17**). Cette partie va dans un premier temps être consacrée aux composantes du microenvironnement tumoral notamment le système immunitaire et vasculaire. Puis elle traitera dans un second temps du rôle de l'ANXA1 dans la modulation de ce microenvironnement.

1- Principales composantes du microenvironnement tumoral

1.1- Le système immunitaire tumoral : concept de l'immunoédition

En 1909, Paul Ehrlich est l'un des premiers à concevoir l'idée que le système immunitaire est capable de prévenir l'évolution d'une cellule néoplasique en tumeur [206], [207]. Une cinquantaine d'années plus tard, Burnet et Thomas suggèrent que le système immunitaire est capable de reconnaître les tumeurs grâce à des antigènes tumoraux (voir ci-après) et ainsi de les éliminer [208], [209]. C'est en 1970 que la théorie de l'immunosurveillance est réellement formulée par Burnet [210]. Cependant, plusieurs études ont échoué à prouver ce concept dans des modèles animaux, menant ainsi à son abandon à la fin des années 1970. Ce n'est que dans les années 1990 que l'intérêt pour

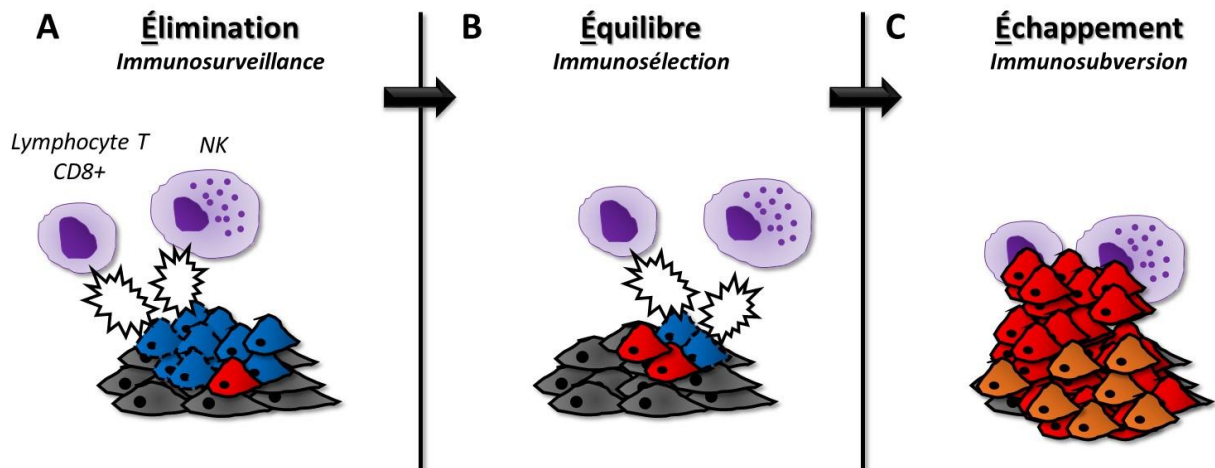


Figure 28 : Les trois phases « E » de l'immunoédition. L'immunoédition se divise en trois grandes phases. **(A)** L'élimination correspond à l'immunosurveillance pendant laquelle les cellules immunitaires cytotoxiques NK (immunité innée) et lymphocyte T CD8+ (immunité adaptative) vont tuer les cellules tumorales (bleues). L'activation de l'immunité adaptative est possible grâce à la présence de néo-antigènes au niveau des cellules tumorales. Ces néo-antigènes permettent d'activer les lymphocytes CD8+ grâce à leur interaction avec les cellules présentatrices d'antigène : les cellules dendritiques. **(B)** L'équilibre représente le processus lors duquel le système immunitaire va sélectionner des variants tumoraux résistants (rouge) capables de survivre à la réponse cytotoxique. De plus, de nouvelles cellules tumorales encore plus résistantes émergent (orange) suite à l'immunosélection. Pendant cette phase, le système immunitaire maintient une pression qui permet de contenir la tumeur sans la détruire. **(C)** L'échappement correspond au développement incontrôlé des différents variants tumoraux et au développement d'un environnement immunosuppresseur, c'est l'immunosubversion. Les cellules normales sont représentées en gris. Les « flash » blancs représentent l'activité cytotoxique (libération de perforine et de granzyme).

Inspiré de Dunn et al, 2002 [213]

l'immunosurveillance est réapparu. En effet, l'évolution des modèles animaux et des connaissances sur le système immunitaire a permis de mettre en évidence l'effet protecteur de l'interféron gamma (IFN γ) et de la perforine vis-à-vis du développement tumoral. Cette cytokine et cette protéine cytolytique sont produites par les lymphocytes de type CD8+ et NK et sont impliquées dans leur activité cytotoxique. Plusieurs études réalisées chez l'homme ont également permis de montrer que les individus immunodéficients présentent un risque plus élevé de développer un cancer par rapport aux individus immunocompétents [211]–[213]. Cependant, l'immunocompétence n'empêchant pas le développement de tumeur, le concept d'immunosurveillance ne résume donc pas entièrement l'activité du système immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales. Ce dernier présente un rôle double dans le développement et la progression des cancers puisqu'il peut à la fois limiter et stimuler ces processus. En 2002, Dunn et ses collaborateurs ont donc introduit la notion **d'immunoédition**. Ce processus se divise en trois grandes phases (les trois « E ») : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (**Figure 28**) [213].

Durant la phase d'élimination, les lymphocytes CD8+ et NK tuent la majorité des cellules cancéreuses. On parle bien ici d'**immunosurveillance**. L'activation de la réponse adaptative (LT CD8+) passe par la reconnaissance d'antigènes tumoraux. Ces antigènes peuvent être classés en fonction de leur profil d'expression tissulaire, de leur origine génomique ou encore de leur statut mutationnel. De façon générale, on distingue deux grands types d'antigènes tumoraux les AAT (antigènes associés aux tumeurs) et les AST (antigènes spécifiques des tumeurs) également appelé néo-antigènes [214]. Parmi les AAT on retrouve les antigènes de différenciation (tissu spécifique) et les antigènes dérivés de gènes surexprimés dans les tumeurs. Dans ces deux cas, les antigènes sont à la fois présents au niveau des cellules tumorales et des cellules normales ce qui favorise le phénomène de tolérance. A l'inverse les néo-antigènes sont spécifiquement exprimés au niveau des cellules tumorales et sont donc plus immunogènes. C'est le cas des antigènes dérivés de protéines virales, de mutations géniques ou encore de gènes normalement exprimés dans les cellules germinales et qui sont exprimés de façon aberrante dans les cellules cancéreuses [214]–[216] (**Figure 29**).

Lors de la seconde phase, un équilibre s'installe entre les cellules immunitaires et certaines cellules tumorales non immunogéniques. On parle ici, d'**immunosélection** puisqu'il va y avoir une sélection de variants résistants, qui finissent par mourir alors que d'autres apparaissent avec des capacités de résistance plus importantes. Au cours de cette phase, le système immunitaire maintient une pression qui permet de contenir la tumeur sans la détruire, cette phase est la plus longue et peut durer plusieurs années [211]–[213], [217].

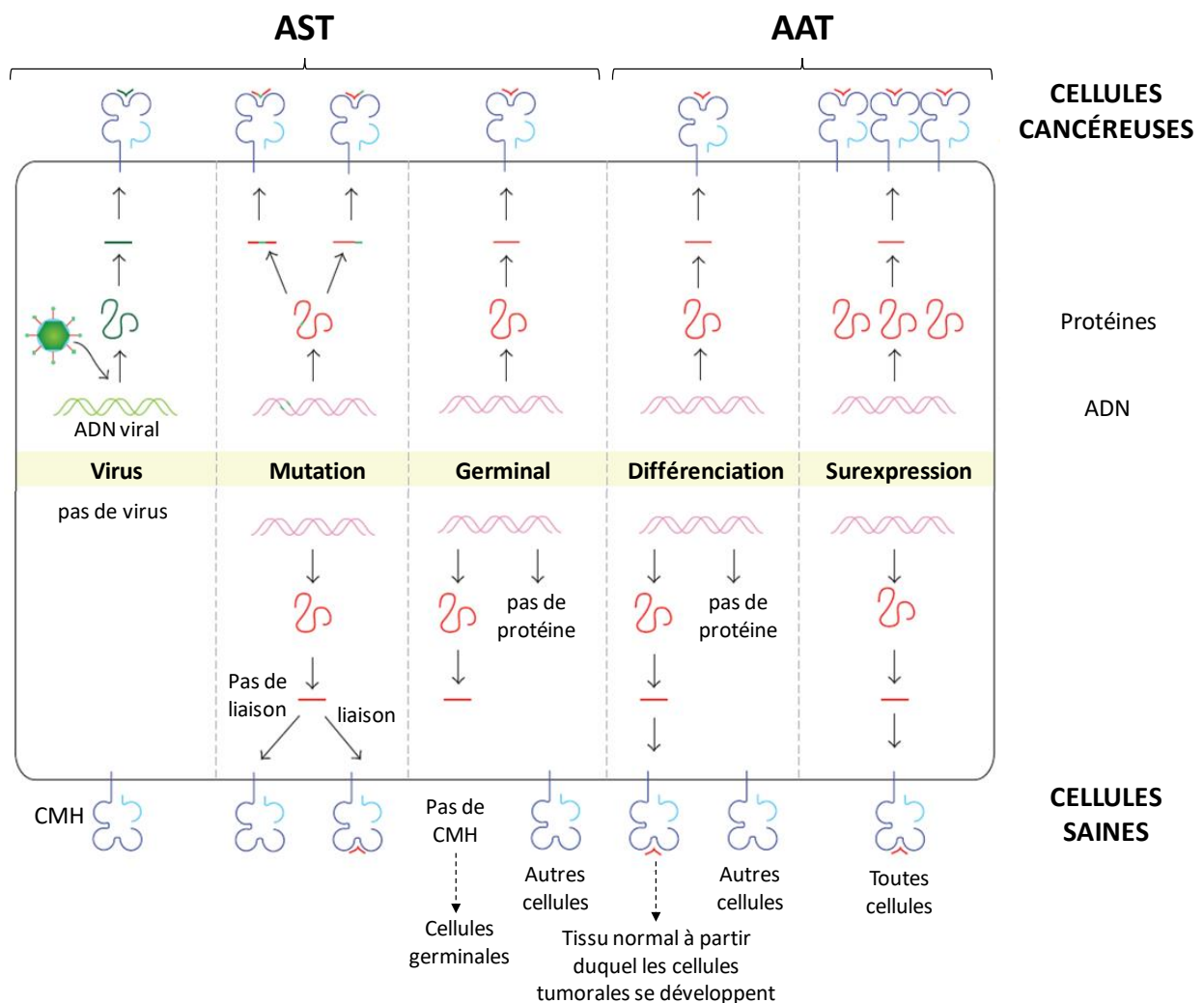


Figure 29 : Les différents types d'antigènes tumoraux. Les antigènes tumoraux peuvent être classés en deux grands groupes, les antigènes spécifiques de tumeurs (AST) et les antigènes associés aux tumeurs (AAT). Les AST comprennent les antigènes issus de virus, de mutations géniques, et d'expression aberrante de gènes normalement restreinte aux cellules germinales. Ces antigènes sont exprimés exclusivement par les cellules tumorales et ne seront présentés aux lymphocytes (via CMH) que dans ces conditions. Dans le cadre des AAT, les antigènes sont exprimés à la fois par les cellules tumorales et les cellules saines favorisant ainsi le phénomène de tolérance immunologique. Parmi les AAT on retrouve les antigènes de différenciation, qui correspondent à des antigènes possédant une expression tissu-spécifique, ainsi que les antigènes issus de protéines surexprimées en condition tumorale.

Adapté de Vigneron, 2015 [215]

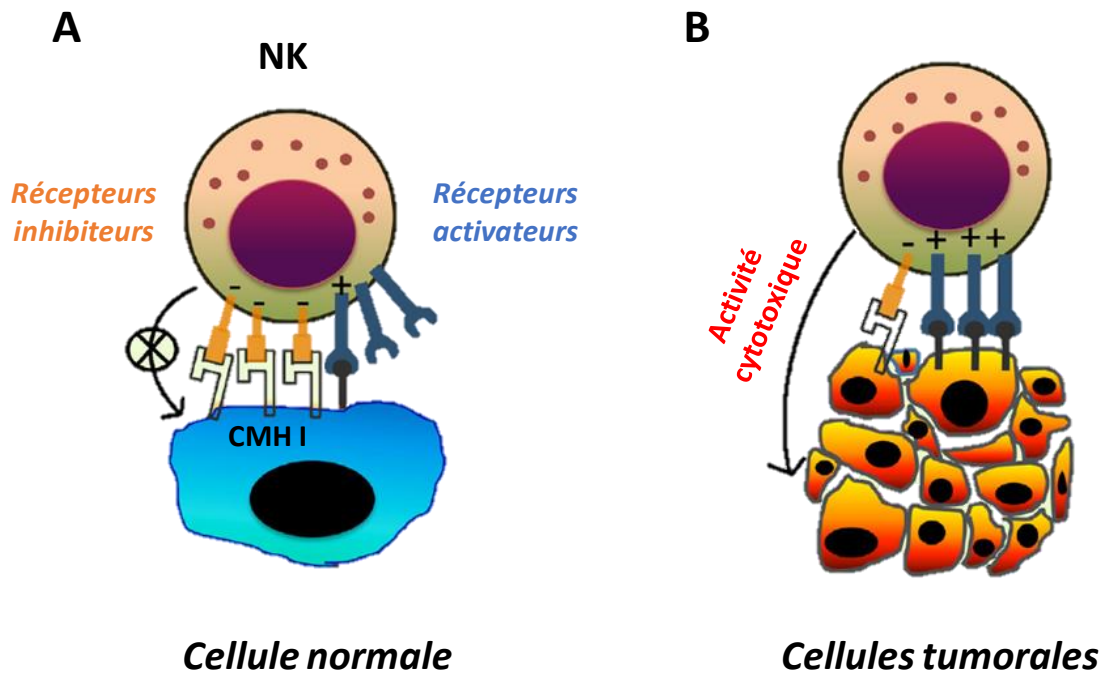


Figure 30 : Activité anti-tumorale des cellules NK. (A) Les cellules normales expriment à leur surface le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) capable de se lier aux récepteurs de type inhibiteurs présents à la surface des cellules NK. Ceci permet d'instaurer une tolérance des NK vis-à-vis des cellules normales. (B) Les cellules tumorales sous-régulent le CMH I et sur-régulent les ligands des récepteurs activateurs des NK. Ceci permet donc d'activer les NK qui vont tuer les cellules tumorales grâce à leurs propriétés cytotoxiques.

Adapté de Paul et al, 2017 [220]

Finalement, les cellules cancéreuses résistantes se développent de façon incontrôlée et prennent le dessus sur les cellules immunitaires lors de la phase d'échappement. Elles vont également favoriser la mise en place d'un environnement immunosuppresseur/immunotolérant en stimulant les cellules immunitaires pro-tumorales tout en inhibant les cellules anti-tumorales (cytotoxiques). On parle ici d'**immunosubversion** [211]–[213]. Ce processus est rendu possible grâce à des contacts directs entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires qui passent par la formation de complexes ligands/récepteurs, et à la sécrétion de diverses cytokines (interleukines, chimiokines...). Ces dernières interviennent dans la communication intercellulaire et sont capables d'agir à distance. Elles sont donc particulièrement impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau du site tumoral.

Ces trois phases participent donc à la mise en place d'un microenvironnement favorable au développement tumoral, et impliquent différentes cellules immunitaires qui agissent avec ou contre la tumeur et sont également capables d'interagir entre elles.

1.1.1- Les cellules lymphocytaires

1.1.1.1- Les lymphocytes effecteurs : anti-tumoraux

Les lymphocytes effecteurs correspondent aux LT cytotoxiques CD8+ (immunité adaptative) et aux cellules NK (immunité innée) qui sont associés à une activité anti-tumorale (phase d'élimination). Contrairement aux cellules CD8+, les NK ne nécessitent pas d'exposition préalable avec un antigène afin d'obtenir des propriétés cytotoxiques, et sont donc capables de déclencher une réponse plus rapidement que les lymphocytes CD8+ [218]. En effet, ces derniers nécessitent l'activation par une CPAg telles que les cellules dendritiques, dans les ganglions lymphatiques, afin d'être activés et de migrer au niveau du site tumoral. L'activité cytotoxique des NK est quant à elle régulée par la présence de récepteurs activateurs comme NKp46 (« *natural killer cell P46-related protein* ») et NKG2D (« *killer cell lectin-like receptor K1* ») et inhibiteurs tel que Ly49 (« *killer cell lectin-like receptor A1* ») [219]. Les cellules normales expriment à leur surface le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) qui agit comme ligand des récepteurs inhibiteurs des NK et induit ainsi une tolérance. Les cellules anormales comme les cellules tumorales ont quant à elle tendance à perdre le CMH I et à sur-réguler des ligands des récepteurs activateurs. Les cellules tumorales sont donc capables d'activer les cellules NK (**Figure 30**) [220].

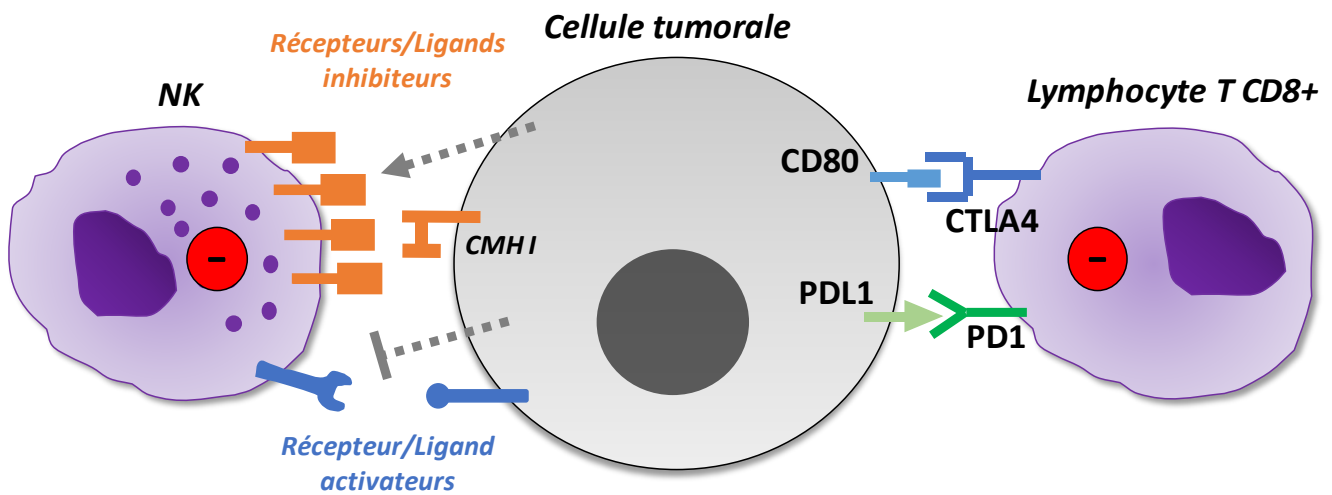


Figure 31 : Mécanismes d'échappement des cellules tumorales aux cellules cytotoxiques. Les cellules cancéreuses sont capables d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale des cellules lymphocytaires de types NK et CD8+ par divers mécanismes. Elles régulent les récepteurs des cellules NK en favorisant les récepteurs inhibiteurs et en inhibant les activateurs. Elles vont également sous-réguler l'expression des ligands activateurs. Les cellules tumorales inhibent également l'activation des lymphocytes CD8+ en exprimant les ligands des récepteurs inhibiteurs CTLA4 et PD1.

Une fois activées, les cellules cytotoxiques s'attaquent aux cellules tumorales en libérant le contenu de leurs granules. La perforine crée des pores dans les cellules qui vont permettre l'entrée des sérine protéases de type granzyme. Ces enzymes vont activer les caspases et ainsi induire l'apoptose des cellules tumorales. Les cellules cytotoxiques sont également capables de sécréter des cytokines anti-tumorales notamment l'IFN γ [220]. Les LT CD8⁺ et les NK sont associés à de bons pronostics dans divers types de tumeurs solides [218]. On distingue d'ailleurs les tumeurs solides dites « froides » et « chaudes » liées respectivement à un faible et à un fort infiltrat lymphocytaire. Les tumeurs froides sont très immunosuppressives et sont associées à un mauvais pronostic par rapport aux tumeurs chaudes [211], [218].

Cependant, les cellules tumorales cherchent à inhiber la réponse immunitaire cytotoxique. Elles sont par exemple capables de réguler le répertoire de récepteurs des cellules NK en favorisant les récepteurs inhibiteurs [218]. Elles sont également capables de limiter leur expression de ligands des récepteurs activateurs des NK [205], [218]. De plus, les cellules tumorales expriment les ligands des récepteurs inhibiteurs des LT CD8⁺ tels que PDL1 (ligand PD1) ou encore CD80 (ligand CTLA4). Elles peuvent ainsi inhiber l'activation des lymphocytes [221] (**Figure 31**). L'activité des lymphocytes effecteurs est également régulée négativement par les autres cellules immunitaires du microenvironnement qui favorisent le développement et la progression tumorale notamment les lymphocytes T régulateurs.

1.1.1.2- Les lymphocytes régulateurs : pro-tumoraux

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) représentent un sous-ensemble des cellules CD4⁺. Ce sont des cellules immunosuppressives qui permettent de prévenir la mise en place d'une inflammation pathologique. Dans beaucoup de tumeurs, la présence importante de Treg est corrélée négativement avec la survie puisque ces cellules sont impliquées dans la modulation négative de la réponse immunitaire anti-tumorale [222].

Les Treg limitent les fonctions des lymphocytes cytotoxiques (CD8⁺ et NK) en sécrétant des facteurs inhibiteurs tels que le TGF- β et les interleukines IL-10 et IL-35 par exemple. Ceci permet de limiter à la fois leur prolifération et leur activité (cytotoxicité et production de cytokines) et favorise donc la progression tumorale. L'activation des LT CD8⁺ passe par l'interaction de leur TCR avec une molécule de CMH porteuse d'un peptide antigénique exposée à la surface des CPAg, notamment les CD. Cette activation nécessite également des signaux de co-stimulation notamment les protéines CD80 et CD86 également exposées à la surface des CD. Dans ce contexte, CD80 et CD86 vont interagir avec

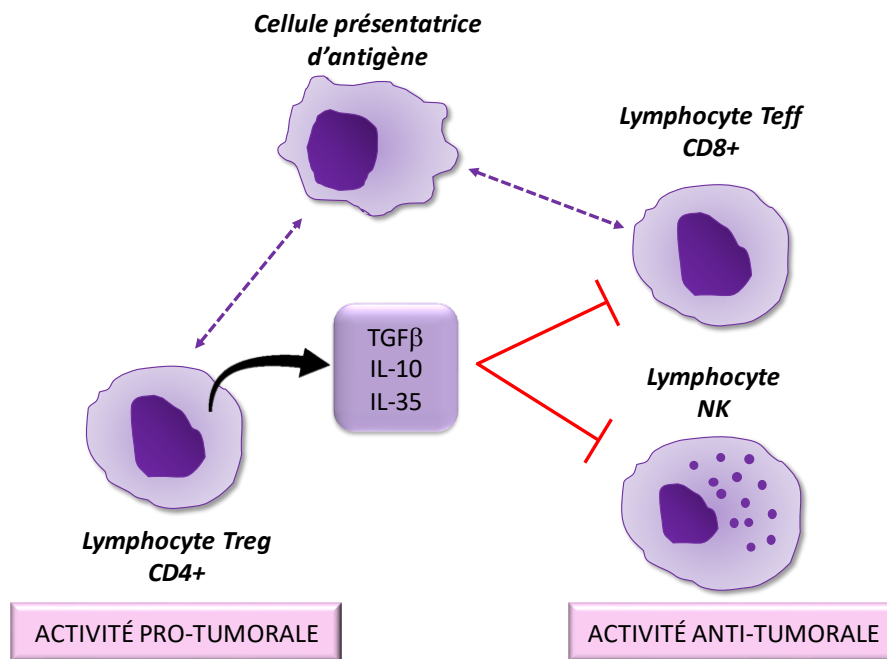


Figure 32 : Inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale par les lymphocytes T CD4+ régulateurs (Treg). Contrairement aux lymphocytes effecteurs (eff) tels que les lymphocytes T CD8+ ou les NK, les lymphocytes régulateurs (Treg) sont associés à une activité pro-tumorale. Ils sont notamment capables par l'intermédiaire de la sécrétion de différents facteurs tels que le TGFβ d'inhiber la prolifération et l'activité des cellules effectrices. De plus, les Treg inhibent également indirectement les lymphocytes CD8+ cytotoxiques en interagissant avec les signaux de co-stimulation (CD80/CD86) des cellules présentatrices d'antigènes, limitant ainsi leur interaction avec le récepteur stimulateur CD28 des lymphocytes CD8+.

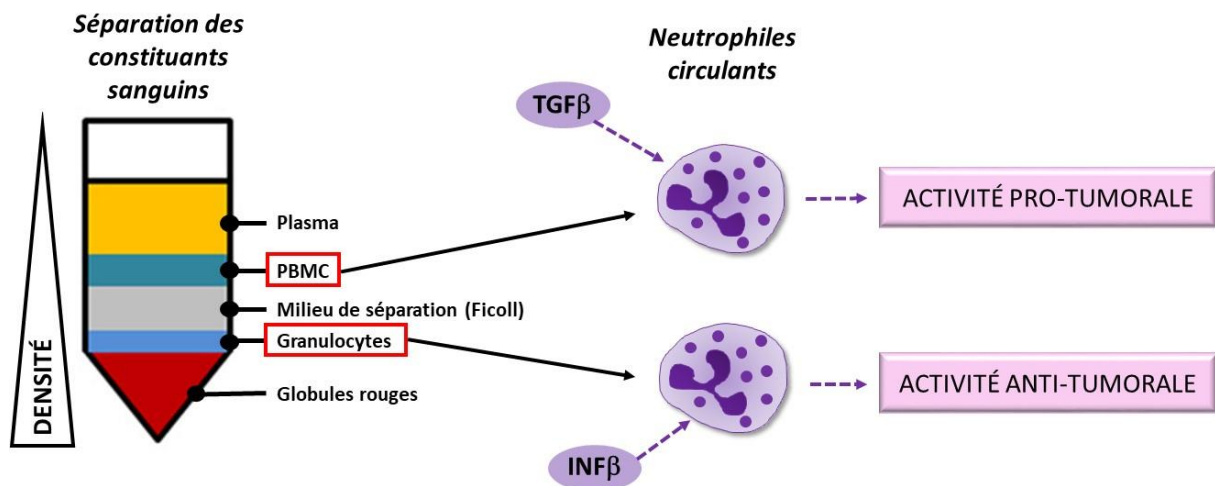


Figure 33 : Neutrophiles circulants pro- et anti-tumoraux. Dans un contexte tumoral, lors de la séparation des constituants sanguins, deux populations de neutrophiles sont identifiées. Les neutrophiles normaux sont retrouvés dans la fraction des granulocytes. Ils sont associés à une activité anti-tumorale et sont stimulés par l'IFNβ. On retrouve une seconde population de neutrophiles de plus faible densité au niveau de la fraction des PBMC qui contient notamment les lymphocytes. Ces cellules sont associées, contrairement aux neutrophiles normaux, à une activité pro-tumorale. Le TGFβ favorise ce type de neutrophiles à l'inverse de l'IFNβ.

le récepteur stimulateur CD28 et favoriser l'activation des lymphocytes contrairement à leur interaction avec le récepteur lymphocytaire inhibiteur CTLA4 [223]. Les Treg expriment les récepteurs CTLA4 qui peuvent entrer en compétition avec CD28 grâce à leur affinité supérieure pour CD80/CD86. Ils sont donc capables de limiter indirectement l'activation des LT CD8+ en séquestrant les signaux de co-stimulation des CPAg [211] (**Figure 32**).

Le recrutement des Treg au niveau des tumeurs se fait par l'intermédiaire de chimiokines comme CCL22 et CCL28 (« *C-C motif chemokine ligand 22, 28* ») exprimées notamment par les cellules tumorales. Chez l'homme, un ratio Treg/Teff (LT effecteurs, CD8+) élevé est associé à un pronostic défavorable dans de nombreux cancers [211]. Contrairement aux LT CD8+, les Treg sont impliqués dans la phase d'échappement de l'immuno-édition comme les autres types cellulaires immunosuppresseurs.

1.1.2- Les neutrophiles

Les neutrophiles font partie des cellules de l'immunité innée et sont des acteurs clés de la réponse inflammatoire [224], [225]. Contrairement aux lymphocytes pour lesquels le rôle au niveau tumoral est bien décrit, des données plus controversées existent en ce qui concerne les neutrophiles. En effet, ils sont à la fois associés à des propriétés pro- et anti-tumorales. Ils peuvent agir au niveau du compartiment sanguin sous leur forme circulante et sont également capables d'infiltrer les tumeurs.

Au niveau circulatoire, le ratio neutrophile/lymphocyte présente une valeur pronostique. En effet, l'augmentation de ce dernier est associée à un pronostic défavorable (survie plus faible des patients) quel que soit le type de cancer analysé [224], [225]. Ceci souligne donc un rôle pro-tumoral de ces cellules circulantes. En réalité, on peut distinguer différents sous-types de neutrophiles dans un contexte tumoral. Suite à une purification des cellules sanguines (Ficoll), les neutrophiles normaux (anti-tumoraux) sont retrouvés au niveau de la fraction granulocytaire de forte densité alors que les neutrophiles immunosuppresseurs (pro-tumoraux) également appelé G-MDSC (« *granulocyte-like myeloid derived suppressor cells* ») sont retrouvés dans la fraction de faible densité correspondant aux PBMC (« *peripheral blood mononuclear cells* ») [224]. Le TGF- β favorise l'acquisition d'un phénotype pro-tumoral à l'inverse de l'interféron β (IFN β) (**Figure 33**) [225]–[227]. Les neutrophiles circulants pro-tumoraux sont capables de supprimer la prolifération et l'activation des cellules T CD8+. Cette suppression implique la sécrétion de molécules telles que les ROS (espèces oxygénées réactives) et l'arginase-1 (Arg-1) qui vont induire un arrêt du cycle cellulaire. De plus, ils sont capables de favoriser

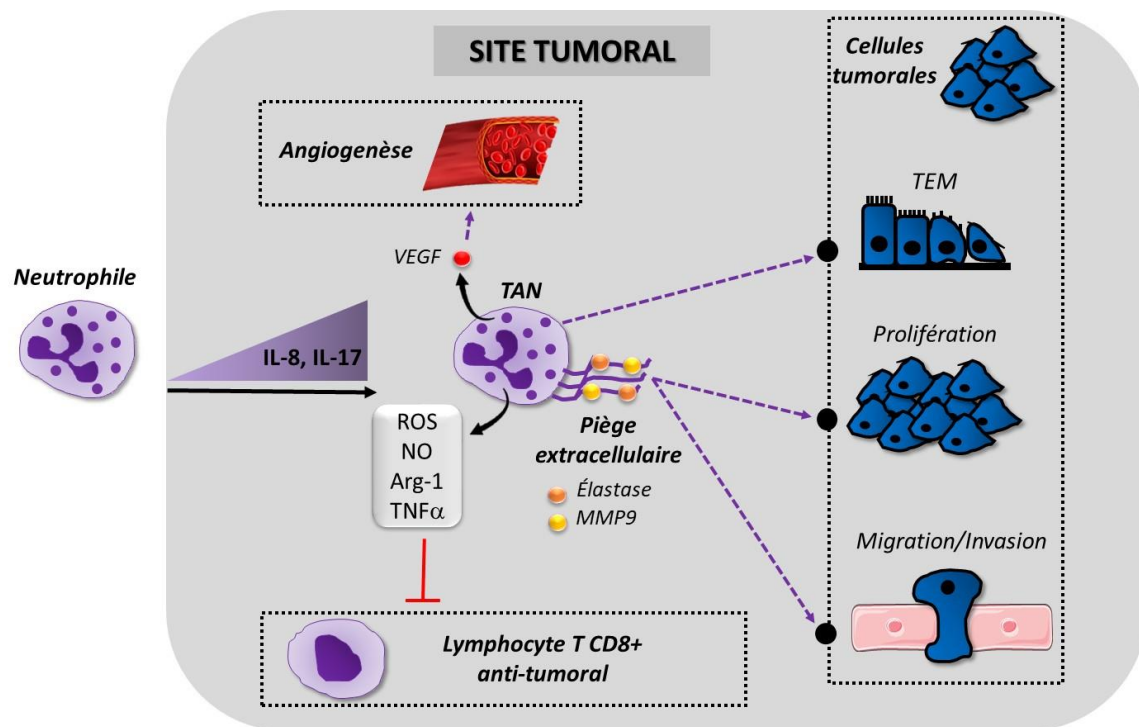


Figure 34 : Activité pro-tumorale des neutrophiles associés aux tumeurs (TAN). Les neutrophiles sont recrutés au niveau du site tumoral par l'intermédiaire d'un gradient de cytokines issus des cellules tumorales mais également d'autres cellules du microenvironnement. Une fois au niveau du site tumoral, les TAN vont stimuler la prolifération, la migration/invasion mais également la TEM des cellules tumorales. Ceci en libérant des facteurs tels que l'élastase, la métalloprotéase MMP9 par l'intermédiaire ou non de « pièges extracellulaires ». Ces pièges sont constitués de fragments d'ADN décondensés ainsi que de protéines. Les TAN vont également stimuler l'angiogenèse en sécrétant du VEGF. De plus, ils sont capables d'inhiber la prolifération et l'activité des cellules cytotoxiques CD8+. L'ensemble de ces fonctions font des TAN des cellules immunosuppressives pro-tumorales.

la formation de métastases en facilitant l'extravasation des cellules cancéreuses circulantes [224], [226].

Les neutrophiles peuvent également être recrutés au niveau du site tumoral, on parle alors de neutrophiles associés aux tumeurs ou TAN. Ce recrutement fait appel à la formation de gradients chimiotactiques de chimiokines telles que l'IL-8 (ou CXCL8) ou encore IL-17. Ces dernières sont produites à la fois par les cellules tumorales et par les cellules du microenvironnement (cellules immunitaires, cellules endothéliales, fibroblastes...) [225]. En fonction des types de cancer, l'infiltration des TAN peut être associée à un bon ou un mauvais pronostic [224], [227]. En effet les TAN peuvent à la fois être pro- et anti-tumoraux. Cependant, dans la majorité des tumeurs, la présence des TAN est corrélée à un pronostic défavorable [226].

Les TAN sont capables de libérer des pièges extracellulaires (NET, « *neutrophil extracellular traps* ») constitués de fragments d'ADN décondensé recouverts de différentes protéines dont NE et MMP9 impliquées dans les phénomènes de prolifération, de migration et d'invasion tumorale [224], [225], [227] (**Figure 34**). Ces NET peuvent être libérés par deux mécanismes distincts. Dans le premier cas, il va y avoir une décondensation de la chromatine suivie de la dissolution de la membrane nucléaire et des membranes des granules. Ceci permet le mélange de la chromatine et du contenu des granules dans le cytoplasme des neutrophiles. Pour finir les NET sont libérés par rupture de la membrane plasmique qui est dépendante de la production de ROS. Ce processus est donc létal. Le second mécanisme, non létal, ne nécessite pas la production de ROS ni la rupture de la membrane puisqu'il passe par le bourgeonnement de vésicules contenant de l'ADN à partir de la membrane nucléaire et finalement la fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique [228], [229]. Les TAN sont également capables de stimuler la TEM des cellules cancéreuses en soutenant l'expression des facteurs de transcription comme Snail. Ils peuvent aussi favoriser l'angiogenèse tumorale en étant une source majeure de VEGF (« *vascular-endothelial growth factor* ») [224], [227]. Les TAN interagissent avec les autres cellules du système immunitaire afin de moduler leurs activités, particulièrement celles des cellules T. En effet, tout comme les neutrophiles circulants, les TAN sécrètent des facteurs tels que les ROS, le NO (oxyde nitrique) ou encore Arg-1 qui inhibent la prolifération des cellules T CD8+ cytotoxiques et leur production d'IFN γ . Certains facteurs comme le TNF α ou encore le NO sont capables de favoriser leur apoptose (**Figure 34**) [224].

Même si les TAN sont largement considérés comme pro-tumoraux, certaines données montrent plutôt un rôle anti-tumoral. En effet, ils peuvent être impliqués dans l'apoptose des cellules cancéreuses par l'intermédiaire de la sécrétion de ROS et via le ligand FasL des récepteurs de mort de

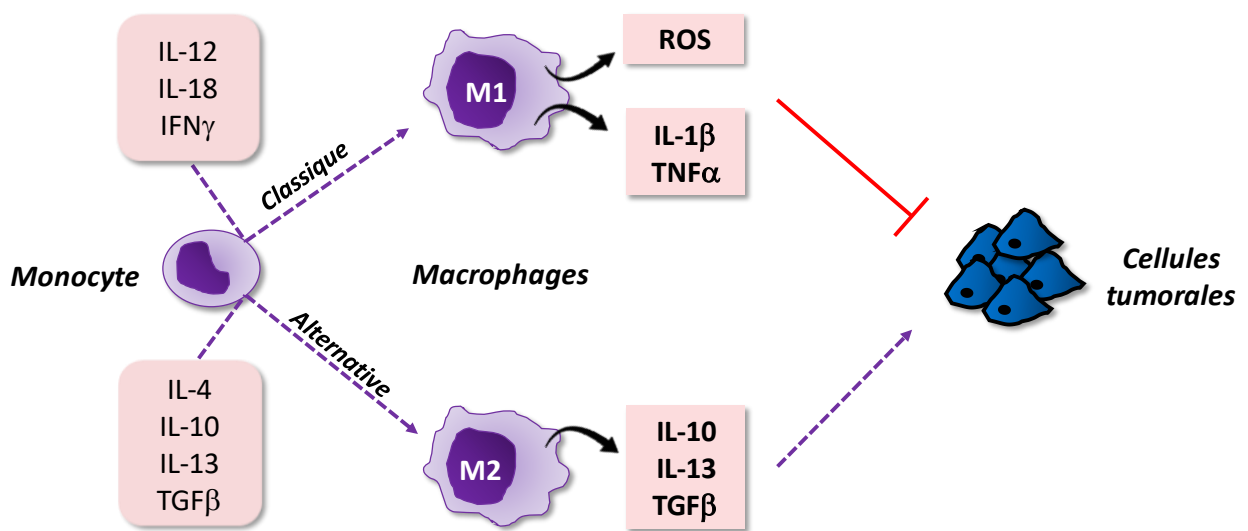


Figure 35 : Polarisation des macrophages. Les monocytes peuvent se différencier en deux grand types de macrophages : les M1 (voie classique) et les M2 (voie alternative). La différenciation en macrophages M1 est favorisée par des cytokines telles que l'IL-12 ou encore l'IL18 alors que la différenciation en M2 dépend de l'IL-4 ou encore IL-10. Les macrophages M1 libèrent des facteurs anti-tumoraux tandis que les macrophages M2 favorisent les cellules tumorales. Au niveau des tumeurs on retrouve en majorité des macrophages de type M2.

type Fas [224], [225]. Ils présentent également une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales opsonisées par des anticorps. De plus, les TAN peuvent être impliqués dans le recrutement et l'activation des cellules T CD4+ et CD8+ [224].

Cette hétérogénéité fonctionnelle reflète l'existence de plusieurs sous-populations de neutrophiles en fonction de leur maturité et de leur densité. Elle peut également s'expliquer par un rôle variable en fonction du stade des tumeurs plus ou moins avancé, du type de tumeurs mais également de la localisation des TAN au sein même des tumeurs et de leur microenvironnement [224], [226]. A l'heure actuelle la majorité des données concernant les neutrophiles dans le contexte tumoral est liée à des études menées chez la souris. L'obtention de données cliniques plus poussées reste donc nécessaire pour mieux comprendre l'implication de ces cellules dans le développement et la progression tumorale.

1.1.3- Les monocytes/macrophages

Les macrophages représentent la population immunitaire la plus abondante du MET. Pour beaucoup de tumeurs solides, la présence importante de macrophages associés aux tumeurs (TAM) est liée à un pronostic défavorable et à une hausse des métastases [230], [231]. Les macrophages présentent deux types de polarisation : M1, se développant suite à une activation dite classique par l'intermédiaire de cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-18 ou encore $INF\gamma$ et M2 suite à une activation alternative liée à l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 ou encore au $TGF\beta$. Les macrophages de type M1 libèrent des facteurs anti-tumoraux comme les ROS ou encore des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1- β , ainsi que le facteur $TNF\alpha$, tous impliqués dans la mort des cellules tumorales. A l'inverse, les macrophages de type M2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires/immunosuppressives en faveur des cellules tumorales comme par exemple l'IL-10 et l'IL-13 ainsi que des facteurs tels que le $TGF\beta$ (**Figure 35**) [230]–[232].

Les lymphocytes infiltrant les tumeurs, activent la différenciation classique des macrophages en M1. Ces derniers sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules cancéreuses (phase élimination) mais également de favoriser la réponse anti-tumorale des LT CD8+ et des NK [211], [227]. Cependant, au fur et à mesure de l'évolution tumorale, les macrophages se différencient en M2, favorisant la croissance et la progression tumorale (phase échappement). On retrouve donc majoritairement des macrophages de type M2 au niveau des tumeurs [233]. Ce phénomène est

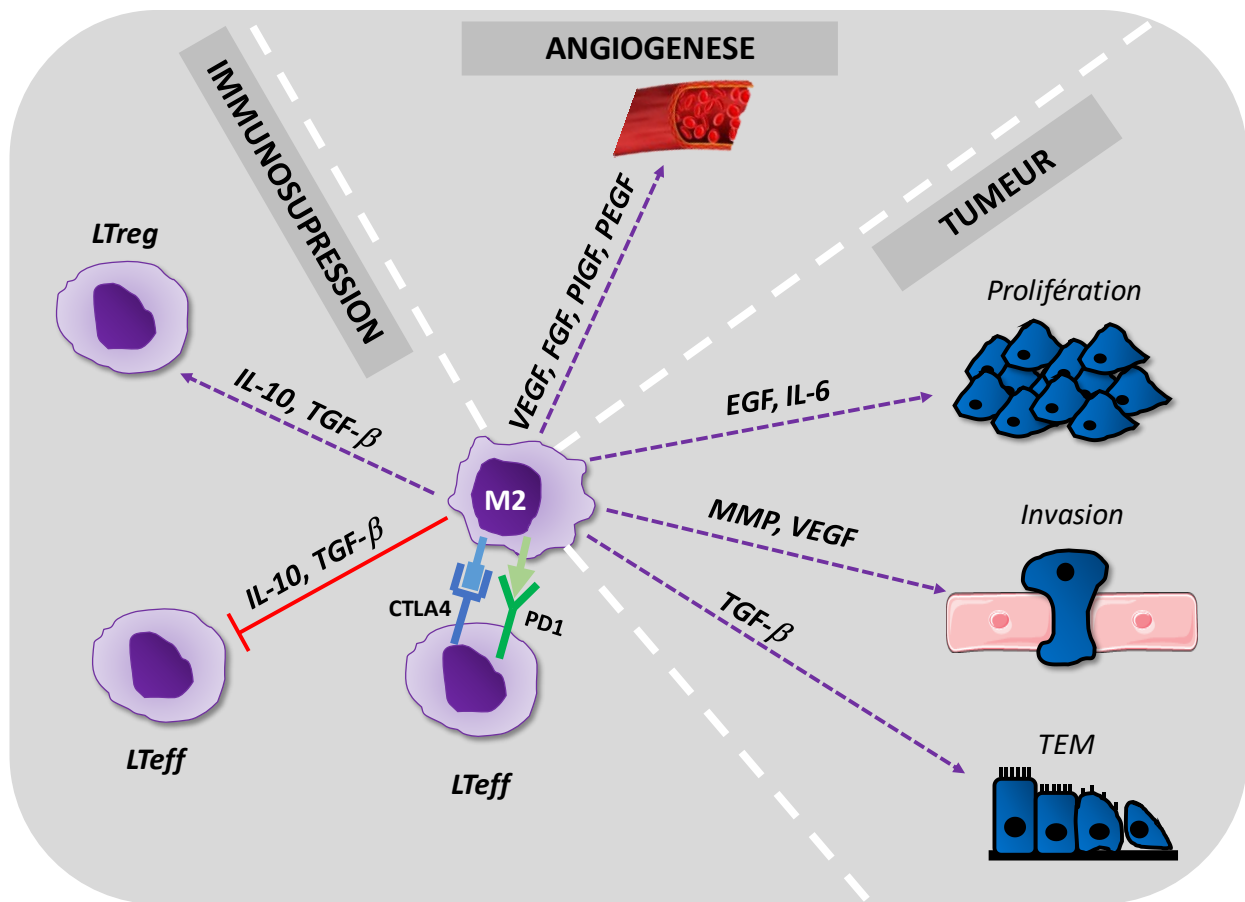


Figure 36 : Fonctions pro-tumorales des macrophages M2. Les macrophages M2 présents au niveau du site tumoral (TAM) sont capables de libérer un grand nombre de facteurs et de stimuler ainsi les cellules tumorales (prolifération, invasion, transition épithélio-mésenchymateuse : TEM) ainsi que l'angiogenèse. Ces cellules instaurent également un environnement immunosuppresseur en limitant l'activation des lymphocytes T effecteur CD8⁺ (L_{Teff}) et en favorisant les lymphocytes T régulateurs (L_{Treg}). Les M2 sont notamment capables d'exprimer les ligands (CD80/86, PDL1) des récepteurs inhibiteurs CTLA4 et PD1 situés au niveau des L_{Teff}.

notamment dirigé par les cellules tumorales via la libération de molécules telles que l'IL-4, l'IL-13 ou encore le TGF β . [227].

Les TAM sont recrutés au niveau de la tumeur par l'intermédiaire du facteur M-CSF (« *macrophage colony-stimulating factor* »). Ils favorisent la croissance tumorale en libérant des facteurs comme l'EGF et l'IL-6, ainsi que la dissémination en stimulant l'invasion par le biais de la production de MMP et de VEGF [211], [227], [230], [231]. De plus, ces cellules sont capables dans certains types de cancer (pancréas, colorectal, foie, sein) de stimuler la TEM, notamment par le biais de la production de TGF β et la modulation subséquente de protéines telles que l'E-cadhérine, la vimentine ou encore le facteur de transcription Snail [205], [230]. Les TAM stimulent la progression tumorale en inhibant l'immunité anti-tumorale. Ils sont capables de supprimer via différents facteurs tels que l'IL-10 et le TGF β la réponse anti-tumorale des LT CD8+ et de favoriser le recrutement des lymphocytes Treg [205], [211], [227], [230]. Les TAM expriment également les ligands PDL1 et CD80/86 impliqués dans la régulation négative des lymphocytes [227]. De plus, les macrophages font partie des contributeurs majeurs de l'angiogenèse tumorale. Ils sont capables de produire des facteurs angiogéniques tels que les VEGF, le FGF (« *fibroblast growth factor* »), PlGF (« *placental growth factor* ») ou encore PDGF (« *platelet derived growth factor* ») (**Figure 36**) [205], [230], [231]. Ils peuvent également recruter les cellules tumorales au niveau des sites vascularisés. Ceci est possible grâce à un dialogue entre les deux types cellulaires. En effet, les cellules tumorales produisent le facteur CSF-1 (« *colony stimulating factor 1* ») qui stimule la sécrétion d'EGF par les macrophages ce qui va donc créer un gradient d'EGF permettant d'attirer les cellules tumorales au niveau des vaisseaux [204], [205], [231].

1.1.4- Les cellules dendritiques (CD)

Les CD sont moins abondantes que les macrophages au niveau du MET mais jouent un rôle important. Ce sont à la fois des cellules phagocytaires et présentatrices d'antigènes professionnelles. Elles sont capables d'activer les lymphocytes dans les ganglions lymphatiques en leur présentant des antigènes tumoraux via les molécules de CMH. Ces cellules sont donc importantes dans l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale adaptative. Cependant, les cellules tumorales sont capables de perturber la fonction des CD en supprimant à la fois leur recrutement et leurs activités. Souvent, les CD infiltrant les tumeurs ne sont pas totalement matures et vont dans ce cas-là être associées à des effets suppressifs vis-à-vis de la réponse immunitaire par le biais de la production des cytokines IL-10 ou IL-6 par exemple. Dans ces conditions, elles vont plutôt favoriser les Treg par rapport aux Teff [211].

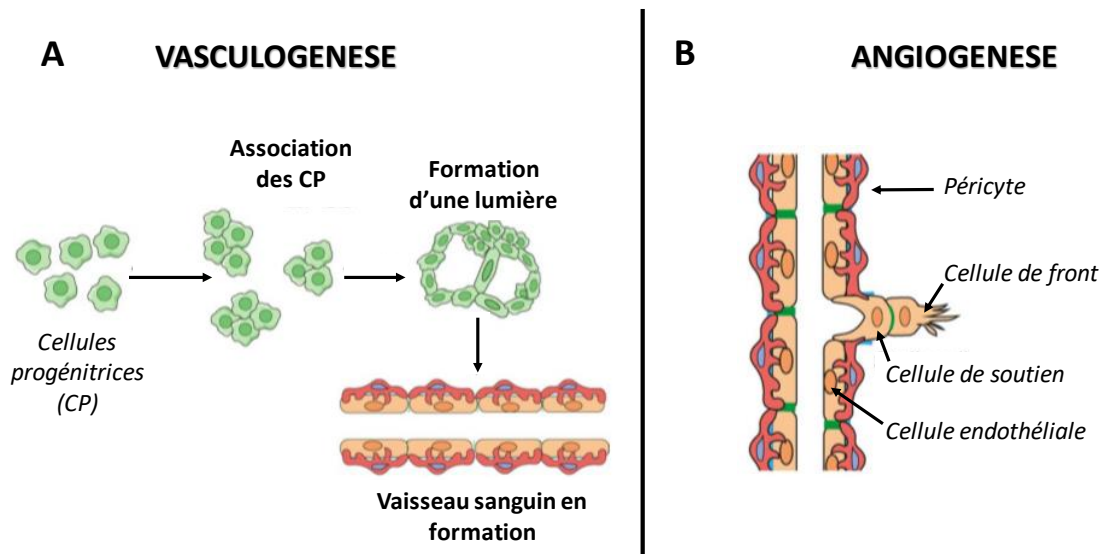


Figure 37 : Processus de formation des vaisseaux. (A) La vasculogénèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de cellules endothéliales progénitrices. Ces cellules prolifèrent puis s’assemblent pour former une lumière puis un vaisseau. **(B)** L’angiogénèse correspond à la formation d’un vaisseau à partir d’un vaisseau préexistant. Une cellule endothéliale sélectionnée en tant que cellule de front va migrer en direction du signal pro-angiogénique et guider ainsi la formation du nouveau vaisseau. Il y a également des cellules de soutien qui vont proliférer en arrière de la cellule de front et permettre ainsi l’allongement du vaisseau.

Adapté de Lugano et al., 2020 [233]

Le MET immunitaire est donc un élément crucial du développement et de la dissémination tumorale. Malgré une réponse immunitaire anti-tumorale efficace lors de la phase d'élimination, la tumeur met en place un grand nombre de mécanismes de résistances et immunosuppresseurs lui permettant de survivre, de proliférer et de se disséminer lors de la phase d'échappement. Des thérapies anti-cancéreuses visant à stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale se sont donc développées telles que les immunothérapies anti-CTLA4 ou encore anti-PD1/PDL1 décrites précédemment (cf partie 2, paragraphes 2.2 et 3.2).

1.2- L'angiogenèse et l'hypoxie tumorale

1.2.1- Le processus d'angiogenèse

1.2.1.1- L'angiogenèse physiologique

Il existe deux processus physiologiques impliqués dans la formation des vaisseaux : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse représente la formation de vaisseaux à partir de la différenciation de cellules endothéliales progénitrices alors que l'angiogenèse correspond à la formation de vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (**Figure 37**) [234]. Au niveau des tissus adultes, l'angiogenèse est plutôt rare et l'endothélium reste stable, à l'exception de certaines conditions comme par exemple la cicatrisation ou encore le cycle menstruel. Cet état de quiescence est maintenu du fait de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques tels que le VEGF ou l'angiostatine respectivement [233], [235]. Le système vasculaire au repos ne contient que 0,5% de cellules endothéliales possédant une activité proliférative.

L'angiogenèse nécessite donc le passage d'un état quiescent à un état actif des cellules endothéliales [234]. Elle est déclenchée majoritairement par des facteurs chimiques comme le VEGF, le FGF, le PDGF mais également le TGF β ou encore les MMP. D'autres facteurs de type environnementaux peuvent également être impliqués comme l'hypoxie (tension en oxygène inférieur à 10 mmHg) [234]. Ces signaux vont activer les cellules endothéliales. Dans un premier temps, une cellule du vaisseau préexistant appelée cellule de front va migrer, guidée par un gradient de signaux pro-angiogéniques. Cette cellule est accompagnée par des cellules endothéliales de soutien qui prolifèrent et permettent l'allongement du nouveau vaisseau (**Figure 37B**) [233]. Ce processus d'angiogenèse est mis à profit dans le contexte tumoral afin de soutenir la croissance et la dissémination des cellules cancéreuses.

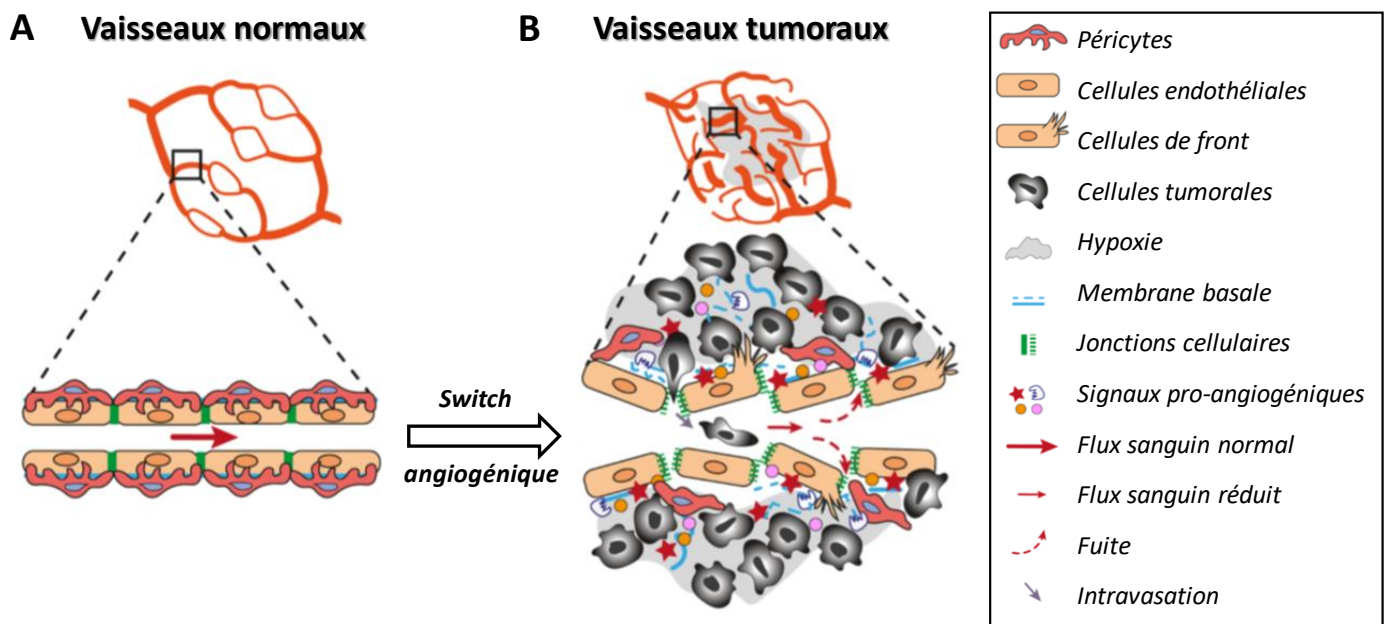


Figure 38 : Organisation des vaisseaux normaux et tumoraux. (A) Les vaisseaux normaux se composent de cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions cellulaires. Elles reposent sur une membrane basale et ont un recouvrement important en péricytes (cellules permettant de stabiliser les vaisseaux). (B) Les vaisseaux tumoraux sont désorganisés et présentent plusieurs défauts comme par exemple la perturbation des jonctions cellulaires, le détachement des péricytes, la diminution du flux sanguin ou encore la présence de fuites. L'ensemble de ces défauts conduit à l'augmentation de l'hypoxie et favorise l'intravasation des cellules tumorales.

Adapté de Lugano et al., 2020 [233]

1.2.1.2- L'angiogenèse tumorale

Comme les cellules normales, les cellules tumorales ont besoin de nutriments et d'oxygène pour survivre et proliférer. Ceci nécessite donc la présence dans un environnement proche de vaisseaux sanguins [233]. L'angiogenèse tumorale est principalement déclenchée par la tumeur elle-même, suite à la présence d'un environnement hypoxique [234], [236]. En effet, du fait de leur hyperprolifération, les cellules tumorales consomment beaucoup d'oxygène, dont l'apport devient insuffisant, ce qui crée des zones dites hypoxiques [233]. Les cellules tumorales libèrent donc des facteurs pro-angiogéniques, notamment le VEGF, qui vont permettre de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux en stimulant la motilité des cellules de front [237]. Ces facteurs sont régulés positivement par les protéines de la famille HIF (« *hypoxia inducible factor* »). Ces protéines forment des hétérodimères HIF1- α /HIF1- β et la sous-unité α est responsable de l'activation transcriptionnelle de gènes pro-angiogéniques en présence d'un environnement hypoxique [233], [235], [237]. Dans le contexte tumoral, on parle souvent de « switch » angiogénique puisque l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques est rompu. L'angiogenèse est donc incontrôlée du fait de la présence et de la persistance de signaux pro-angiogéniques dans le microenvironnement [233].

Contrairement aux vaisseaux normaux, les vaisseaux tumoraux possèdent des défauts structuraux et fonctionnels. En effet, ils présentent une structure chaotique désorganisée. La perturbation des jonctions endothéliales entraîne une perméabilité importante associée à des fuites et à une réduction du flux sanguin. On peut également noter que les vaisseaux tumoraux sont déformés et ont des diamètres variables ce qui peut également modifier le flux sanguin. De plus, les péricytes qui ont pour fonction de stabiliser les vaisseaux ont tendance à se détacher des vaisseaux tumoraux et la membrane basale se distribue de façon inégale. Ceci augmente donc la fragilité des structures vasculaires ainsi que le risque d'hémorragie. Ces caractéristiques anormales du système vasculaire tumoral augmentent l'hypoxie et potentialisent donc la formation de nouveaux vaisseaux favorisant ainsi la formation de métastases (**Figure 38**) [233], [234], [236].

D'autres cellules sont également capables de promouvoir l'angiogenèse tumorale notamment les cellules immunitaires. Les TAM sont capables de favoriser l'angiogenèse en libérant des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF ou encore le FGF. De plus ils sécrètent d'autres facteurs comme par exemple les MMP qui permettent de dégrader la membrane basale ainsi que la MEC et ainsi stimuler la migration et la prolifération des cellules endothéliales. A la manière des TAM, les TAN sont capables de réguler positivement l'angiogenèse en produisant des facteurs comme le VEGF ou encore MMP9. Ces cellules constituent d'ailleurs une des principales sources de VEGF [233], [237].

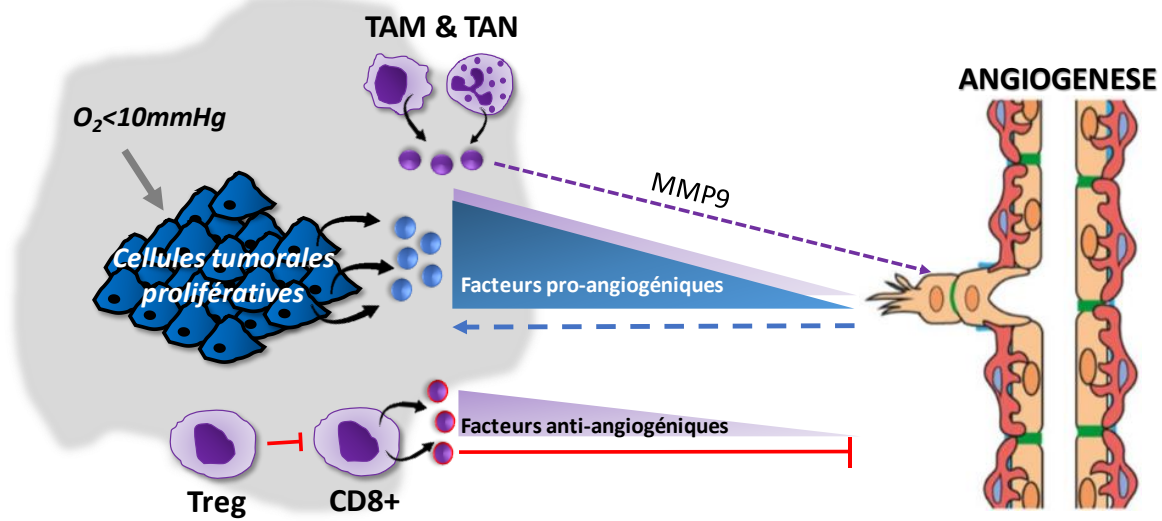


Figure 39 : Régulation de l'angiogénèse par les cellules tumorales et immunitaires. L'angiogénèse tumorale est principalement stimulée par les cellules tumorales elles-mêmes dans un contexte hypoxique dû à leur forte prolifération. Elles libèrent des facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF, créant ainsi un gradient capable de stimuler et de guider l'angiogénèse. De façon similaire, les macrophage (TAM) et les neutrophiles (TAN) associés aux tumeurs sont également capables de stimuler ce processus. Ils libèrent également d'autres protéines, comme la métalloprotéase MMP9, qui vont intervenir dans la dégradation de la membrane basale et ainsi favoriser la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Les cellules lymphocytaires de type Treg favorisent également l'angiogénèse en inhibant les lymphocytes cytotoxiques CD8+ capables de libérer des facteurs anti-angiogéniques comme l'IFN γ par exemple.

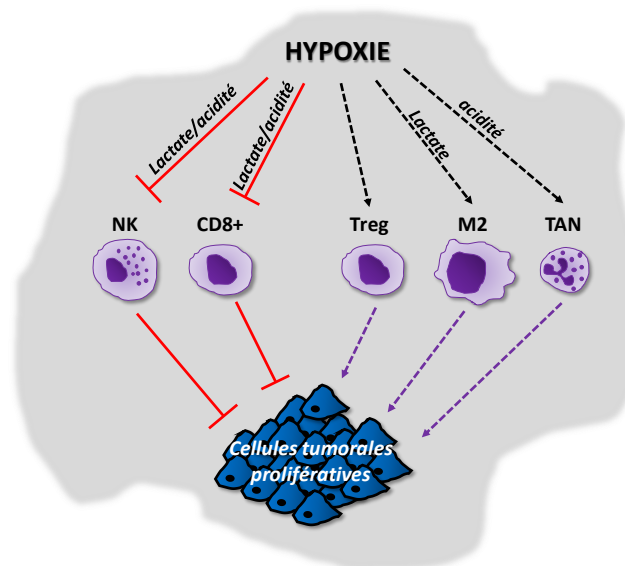


Figure 40 : Régulation des cellules immunitaires par l'hypoxie. L'hypoxie tumorale créée par l'hyperprolifération des cellules tumorales et par la mise en place d'un système vasculaire défaillant est capable de moduler les cellules immunitaires du microenvironnement. Ceci dans le but de favoriser le maintien d'un environnement immunosuppresseur favorable au développement tumoral. En effet, l'hypoxie tumorale inhibe les cellules cytotoxiques (NK et CD8+) et stimule les cellules immunosuppresseuses telles que les lymphocytes Treg, les macrophages de type M2 ou encore les neutrophiles (TAN). Le lactate extracellulaire issu des cellules tumorales suite à la glycolyse anaérobie peut également être impliqué dans la régulation de ces cellules. La présence de ce dernier entraîne une acidification du milieu extracellulaire qui permet également de promouvoir l'immunosuppression.

Les lymphocytes cytotoxiques libèrent quant à eux des facteurs comme l'INF γ qui ont plutôt une activité anti-angiogénique [233]. A l'inverse, les Treg, de par leur activité inhibitrice sur les lymphocytes cytotoxiques (cf partie 3, paragraphe 1.1.1.2), facilitent indirectement l'angiogenèse tumorale (**Figure 39**) [237].

1.2.2- Influence de l'hypoxie tumorale sur les cellules immunitaires

L'hypoxie causée par la forte consommation d'oxygène des cellules tumorales prolifératives est renforcée par la mise en place d'un système vasculaire déficient. En plus d'agir sur l'angiogenèse, elle constitue un moteur majeur de la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur. En effet, les cellules du système immunitaire sont très sensibles à l'hypoxie. Cette dernière est impliquée dans la réduction de la survie ainsi que de l'activité cytotoxique et migratoire des cellules effectrices : les LT CD8+ et les NK. Cette action passe par exemple par l'induction de la production de cytokines immunosuppressives au détriment de cytokines immunostimulatrices, par la stimulation des macrophages de type M2 ou encore l'induction de l'expression des protéines impliquées dans les points de contrôles immunitaires inhibiteurs. L'hypoxie stimule également le recrutement des lymphocytes Treg [236].

Elle entraîne également des changements métaboliques au niveau du MET comme par exemple une augmentation du lactate extracellulaire, associée à une acidification du milieu due à la glycolyse anaérobie des cellules tumorales (effet Warburg). Le fort niveau de lactate extracellulaire entraîne une inhibition des lymphocytes effecteurs. En effet, le lactate diminue la production des protéines cytotoxiques (perforine et granzyme) ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 et l'IL-12. Il régule également la viabilité de ces cellules en stimulant leur apoptose tout en diminuant leur prolifération. De façon opposée, le lactate stimule les cellules immunosuppressives telles que les macrophages M2 [236], [237]. La présence d'un microenvironnement acide est également capable de favoriser l'immunosuppression en limitant l'apoptose des neutrophiles et en limitant la prolifération et l'activité des cellules lymphocytaires cytotoxiques (**Figure 40**) [236].

De façon générale, l'hypoxie induit l'angiogenèse en agissant à la fois sur les cellules tumorales et sur les cellules immunitaires en stimulant les cellules immunosuppressives et pro-angiogéniques. La formation d'un système vasculaire déficient amplifie ce phénomène d'hypoxie et favorise la mise en

place d'un environnement favorable à la progression tumorale. Tout comme le système immunitaire, les vaisseaux tumoraux constituent donc une cible intéressante pour le développement de thérapies anti-cancéreuses. En effet, les vaisseaux apportent à la fois des nutriments et de l'oxygène aux tumeurs et leur fournissent une voie de transport pour leur dissémination dans l'organisme et donc la formation de métastases. La principale cible des agents anti-angiogéniques est le VEGF. Certaines molécules telles que le bevacizumab ou encore le pazopanib sont d'ailleurs appliquées pour le traitement de certains cancers [233], [234]. Cependant les thérapies ciblant l'angiogenèse présentent des effets limités sur la survie globale des patients. Elles limitent la progression tumorale mais n'éradiquent pas les tumeurs, elles sont donc souvent associées à d'autres types de thérapies (ex : chimiothérapie) [234]. De plus, comme pour de nombreuses stratégies thérapeutiques ciblées, des phénomènes de résistance se mettent en place et les tumeurs deviennent plus hypoxiques et donc également plus agressives.

1.3- Autres composants du microenvironnement tumoral

1.3.1- Les fibroblastes associés au cancer (CAF)

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) représentent une des populations cellulaires les plus abondantes dans le MET et dérivent majoritairement des fibroblastes résidents des tissus [237], [238]. Dans les tissus normaux, les fibroblastes sont au repos et ne s'activent que dans des contextes particuliers comme la cicatrisation. Contrairement aux fibroblastes normaux, les CAF ont des capacités prolifératives et migratoires augmentées et sont capables de produire de nombreux facteurs comme par exemple le TGF β ou encore les facteurs de croissance tels que le HGF (« *hepatocyte growth factor* ») ou encore le PDGF [237]–[240]. Les CAF peuvent être activés par l'hypoxie tumorale mais également par le TGF β ou encore des facteurs de croissance comme l'EGF et le FGF2 libérés par les cellules tumorales et immunitaires [237]–[239].

Le rôle pro-tumoral de ces cellules a été très étudié à la fois *in vitro* et *in vivo*. Elles sont notamment capables de réguler le microenvironnement immunitaire. Les CAF stimulent par l'intermédiaire de facteurs tels que le TGF β ou encore l'IL-10 la différenciation des macrophages de type M2. De façon réciproque, les M2 stimulent également les CAF. Par l'intermédiaire de la production importante de TGF β et d'IL-6, les CAF sont également capables de limiter la réponse immunitaire anti-tumorale en limitant l'activation et l'activité cytotoxique des cellules lymphocytaires de type NK et CD8+. En effet, les CAF réduisent par exemple la fonction des cellules CD8+ en inhibant leur expression de perforine, granzyme et INF γ et en inhibant les cellules dendritiques qui les activent

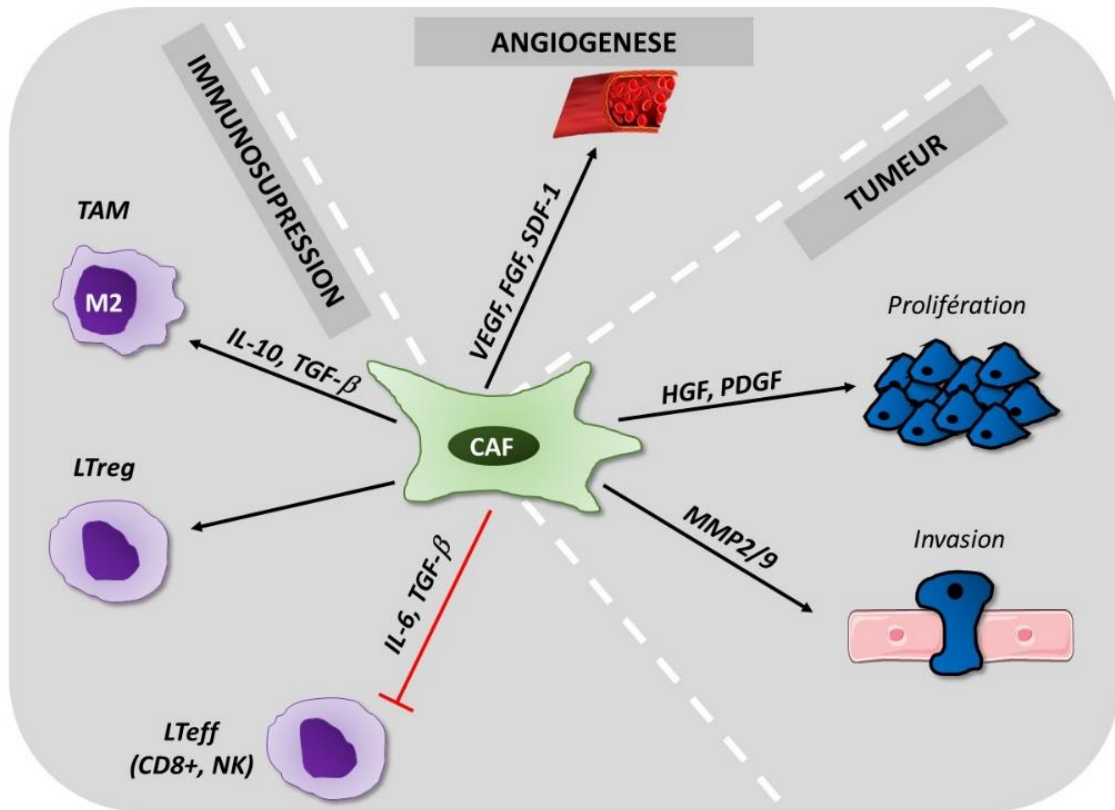


Figure 41 : Rôle des fibroblastes associés aux cancers (CAF) dans le microenvironnement tumoral.

Les CAF sont en grande partie issus des fibroblastes résidents au niveau des tissus. Une fois transformés en CAF par différents signaux à la fois tumoraux et immunitaires, les fibroblastes vont participer de différentes façons au développement et à la progression tumorale. Ces cellules agissent par le biais de différents facteurs à la fois sur la prolifération et l'invasion cellulaire mais également sur l'immunosuppression et l'angiogénèse. Les CAF jouent donc un rôle important dans le microenvironnement tumoral et favorisent ainsi les tumeurs.

[238]. Par contre, ils favorisent le recrutement des Treg pro-tumoraux en sécrétant la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1, « *stromal cell-derived factor 1* ») [241]. Les CAF sont également capables de sécréter MMP2 et MMP9 ce qui favorise la prolifération et l'invasion des cellules tumorales [240]. Ils peuvent aussi soutenir l'angiogenèse en libérant du VEGF mais également d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le FGF et SDF-1 (**Figure 41**) [237], [240]. En plus de leurs nombreuses fonctions, les CAF constituent également la source et le modulateur principal de la MEC, capable de moduler l'évolution tumorale [242], [243].

1.3.2- La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire est composée de protéoglycanes, de protéines fibreuses comme le collagène et l'élastine ainsi que de protéines d'adhésion telles que la fibronectine ou encore la laminine. C'est une structure très dynamique qui subit des remodelages afin de s'adapter aux besoins des cellules [244]. Ces dernières interagissent avec la MEC par l'intermédiaire de récepteurs d'adhésion comme les intégrines. La MEC constitue à la fois un soutien structural et biochimique pour les cellules et les tissus [237], [244]. En effet, on la retrouve notamment au niveau des membranes basales qui soutiennent les cellules épithéliales et endothéliales [245]. Elle est également impliquée dans la communication, l'adhésion ainsi que la prolifération cellulaire. Elle peut par exemple lier des facteurs de croissance et contrôler ainsi leur disponibilité [244]. Plusieurs de ces facteurs sont activés suite à la dégradation de la MEC par des protéines telles que les MMP tout comme les facteurs pro-angiogéniques VEGF, FGF et TGF β par exemple [237], [244]. La MEC constitue donc un important réservoir de protéines pro-tumorales. Elle représente dans beaucoup de tumeurs près de 60% de la masse tumorale et est produite en grande majorité par les CAF mais également par les cellules tumorales elles-mêmes. La MEC tumorale se distingue de la MEC des tissus normaux à la fois en termes de composition et d'organisation. En effet, elle est plus abondante, plus dense et plus rigide que la MEC normale, formant ainsi une barrière qui favorise notamment l'hypoxie et limite la diffusion des traitements [242]. Elle subit de nombreux remodelages dont sa dégradation par des protéases lors du passage des cellules tumorales à travers la membrane basale ou encore lors du processus invasif [239]. La MEC est aussi impliquée dans le processus migratoire et fournit aux cellules un support, favorisant ainsi leur déplacement [239].

2- ANXA1 et microenvironnement tumoral

L'ANXA1 est une protéine multifonctionnelle présente au niveau de différents types cellulaires. Si cette protéine a déjà montré son importance au niveau des cellules tumorales, plusieurs études ont évalué le rôle de l'ANXA1 au niveau des cellules du MET (cellules stromales). L'utilisation de souris invalidées pour l'*Anxa1*, porteuses de tumeurs, a permis de mettre en lumière l'importance de cette protéine au niveau des cellules de l'hôte dans la régulation de la croissance et de la dissémination tumorale. Il a effectivement été démontré dans plusieurs modèles syngéniques (mélanome et cancer du poumon [246], cancer du sein [247]) que l'absence d'expression de l'ANXA1 chez l'hôte entraîne une diminution des volumes tumoraux et de la formation de métastases *in vivo*. D'autres études réalisées sur des modèles de cancer mammaire induit par un carcinogène [248] (7,12-dimethylbenz[a]anthracene, DMBA) ou spontané (modèle MMTV-pyMT) [174], ont montré une augmentation des volumes tumoraux chez les souris invalidées par rapport aux souris sauvages. Dans le cadre du modèle MMTV-pyMT, l'augmentation des volumes tumoraux chez les souris invalidées pour l'*Anxa1* est associée à une diminution du développement de métastases pulmonaires [174]. L'absence d'expression de l'*Anxa1* par les souris est donc associée à une diminution des métastases dans différents types de cancer. L'ANXA1 joue donc un rôle important à la fois au niveau des cellules tumorales mais également au niveau des cellules du microenvironnement.

2.1- ANXA1 et microenvironnement immunitaire

Comme vu précédemment, l'immunité joue un rôle important dans le développement ainsi que la progression tumorale (cf partie 3, paragraphe 1.1) et l'ANXA1 est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et son action sur diverses cellules du système immunitaire (cf partie 1, paragraphe 3.2). Il est donc intéressant de s'interroger sur l'implication de cette dernière dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

2.1.1- Rôle stimulateur de l'ANXA1 sur les cellules immunitaires pro-tumorales

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de l'ANXA1 dans la polarisation des macrophages. En 2011, Li et ses collaborateurs ont montré que le traitement des macrophages humains U937 avec l'ANXA1 augmente la libération d'IL-10 (M2) et diminue la production de TNF α (M1). L'ANXA1 est donc capable de favoriser la polarisation des macrophages en M2 et ceci de façon dépendante des récepteurs FPR2 [249]. De plus, Moraes et ses associés ont montré que l'ANXA1 endogène des macrophages est également importante pour leur polarisation puisque les macrophages issus de souris invalidées pour l'*Anxa1* échouent à se différencier en M2 suite à leur stimulation par l'IL-4 *in vitro*. *In vivo*, les tumeurs 4T1 (cellules murines de cancer du sein) développées chez des souris qui n'expriment pas l'*Anxa1* présentent moins de macrophages et une polarisation majoritairement de type M1 [247]. Plus récemment, une étude réalisée à partir de données issues d'une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein (METABRIC, « *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium* », n=1904), a permis de montrer que les tumeurs présentant un niveau élevé d'ANXA1 sont associées à un infiltrat plus important en macrophage de type M2 par rapport aux tumeurs présentant un plus faible niveau d'ANXA1 [159]. En plus de son rôle sur leur polarisation, l'ANXA1 des macrophages est également importante dans la régulation de l'agressivité tumorale. En effet, la co-culture de cellules 4T1 avec des macrophages M2 issus de souris sauvages stimule la croissance et l'invasion tumorale. A l'inverse, les macrophages issus de souris invalidées pour l'*Anxa1* présentent des effets limités sur ces deux processus [247].

Une analyse récente s'est quant à elle intéressée au rôle de l'ANXA1 sur les cellules lymphocytaires de type Treg. Les auteurs ont dans un premier temps montré que les tumeurs des patientes atteintes d'un CSTN, présentent une augmentation du niveau plasmatique d'ANXA1 mais également une augmentation du nombre de Treg tumoraux par rapport aux autres sous-types. Ils ont dans un second temps mis en lumière la plus forte expression du récepteur à l'ANXA1 : FPR2, au niveau des Treg par rapport aux Teff. De plus, le blocage de l'axe ANXA1/FPR2 par l'antagoniste Boc1 entraîne une diminution de l'expression de granzyme A, impliqué dans la suppression des NK et des LT CD8+, par les Treg. Pour finir, l'analyse de tumeurs murines 4T1 développées chez des souris Balb/c traitées ou non avec Boc1 a permis de mettre en évidence une augmentation du marqueur cytotoxique CD8a ainsi qu'une inhibition du marqueur des Treg FOXP3 au niveau des tumeurs des souris traitées. L'ensemble de ces données souligne donc un probable rôle stimulateur de l'ANXA1 vis-à-vis des cellules lymphocytaires de type Treg et donc une fonction pro-tumorale [250].

2.1.2- Rôle stimulateur de l'ANXA1 sur la mort immunogénique

L'apoptose cellulaire a longtemps été considérée comme un processus non immunogène. Cependant l'existence du phénomène de mort immunogénique (ICD, « *immunologic cell death* ») a remis en question ce principe [251]. En effet, cette dernière se définit par la capacité des cellules mourantes à déclencher une réponse immunitaire adaptative robuste contre leurs propres antigènes [252], [253]. Les cellules vont dans un premier temps libérer des signaux de danger (DAMP, « *damage associated molecular patterns* ») qui vont à la fois recruter et stimuler les CPAg notamment les cellules dendritiques. Ces dernières vont phagocytter les cellules mourantes et activer par la suite les lymphocytes cytotoxiques par le biais de la présentation d'antigènes et de la sécrétion de cytokines immunostimulatrices. Les lymphocytes ainsi activés vont être capables d'éliminer spécifiquement les cellules résiduelles [253], [254].

Différents types de traitements anti-cancéreux sont capables d'induire l'ICD comme par exemple les chimiothérapies comme les anthracyclines (doxorubicine, mitoxantrone), le bortézomib, l'oxaliplatine [251], [252], [254] mais également les irradiations (radiothérapie) [251], [255]. Les inducteurs de l'ICD déclenchent deux grands types de stress cellulaire : l'autophagie et le stress du RE [253], [254].

L'autophagie mène à la libération d'ATP (adénosine triphosphate) par les cellules mourantes, qui va jouer le rôle d'agent chimiotactique. En effet, les CPAg vont reconnaître l'ATP grâce aux récepteurs métabotropiques purinergiques P2Y2 et P2Y7. Les récepteurs P2Y2 sont associés au recrutement des CPAg et les P2Y7 à la libération d'IL-1 β pro-inflammatoire capable d'activer la réponse adaptative lymphocytaire [251], [253], [254].

Le stress du RE induit quant à lui une réponse de type UPR (« *unfolded protein response* ») dans le but de limiter la traduction protéique, d'augmenter les capacités de repliement des protéines ou encore de dégrader les protéines mal repliées. Elle fait intervenir des protéines membranaires comme PERK (« *PKR-like ER protein kinase* »), IRE1 (« *inositol requiring enzyme 1* ») ou encore ATF6 (« *activating transcription factor 6* »). Lors d'un stress prolongé, la réponse UPR peut déclencher l'apoptose cellulaire et la libération de DAMP comme la calréticuline (**CRT**) [252]. Cette dernière est une protéine chaperonne associée au RE et est impliquée dans le contrôle qualité de la synthèse des protéines [254]. Lors de l'ICD, la CRT est exposée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique [252], [254]. Dans le cadre des chimiothérapies, l'exposition de la CRT nécessite la phosphorylation du facteur eIF2a (« *eukaryotic translation initiation factor 2A* ») par la protéine PERK suivie notamment par l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (« *BCL2 antagonist*

killer ») [253], [254]. L'externalisation de la CALR est un évènement précoce lors de l'apoptose puisqu'elle précède l'exposition des PS au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique [253]. Une fois exposée à l'extérieur des cellules mourantes, la CRT joue le rôle de signal « mange-moi » qui va permettre la reconnaissance de ces dernières par les cellules phagocytaires, notamment les CD [253]. Cette reconnaissance passe par l'interaction de la CRT avec les récepteurs CD91, également appelé LRP1 (« *low density lipoprotein receptor-related protein 1* »). Ceci stimule la phagocytose des cellules mortes ainsi que la captation des antigènes par les CD [251], [254]. L'exposition de la CRT suite au stress du RE est donc primordiale pour le bon déroulement de l'ICD. En 2012, Krysko et ses collaborateurs ont de ce fait proposé une classification des inducteurs de l'ICD en fonction de leurs capacités à cibler le RE. Les inducteurs de type I induisent le stress du RE ainsi qu'une apoptose par des mécanismes distincts mais convergents alors que les type II induisent une apoptose directement due au stress du RE [255].

La protéine nucléaire **HMGB1** (« *high mobility group box 1* ») est également impliquée dans l'ICD en tant que DAMP. Elle est associée à la chromatine et régule la transcription. Lors de l'induction de l'ICD, HMGB1 est libérée dans le milieu extracellulaire par les cellules mourantes et exerce une fonction immunostimulatrice sur les CPAg par l'intermédiaire des récepteurs PRR (« *pattern recognition receptor* ») de type TLR2 et TLR4 (« *toll like receptor 2/4* ») [252], [254]. L'interaction d'HMGB1 avec ces récepteurs permet de stimuler la maturation des CPAg [256].

Le rôle de l'**ANXA1** dans l'ICD a été mis en lumière par Vachelli et ses collaborateurs en 2015. Ils ont dans un premier temps montré sur une cohorte de femmes présentant un cancer du sein traité par chimiothérapie adjuvante, que la perte de fonction du gène *FPR1* est associée à une réduction de la survie globale des patientes. Cet effet a également été observé au niveau de cohorte de patients présentant un cancer colorectal et traités à l'oxaliplatine. L'appui d'expérimentation *in vitro* a également permis de mettre en évidence la contribution de l'expression du gène *FPR1* par le système immunitaire de l'hôte dans l'effet anti-tumoral des anthracyclines. De plus, l'utilisation de cellules génétiquement invalidées pour différents ligands de *FPR1* a permis de souligner l'implication de l'ANXA1 tumorale dans l'induction de la réponse immunitaire anti-cancéreuse dépendantes des anthracyclines. Sur le plan fonctionnel, l'ANXA1 libérée par les cellules tumorales traitées est donc capable d'agir en tant que DAMP et de se lier aux récepteurs *FPR1* présents sur les cellules dendritiques. Ceci permet donc de créer une synapse immunologique entre ces deux types cellulaires en positionnant les cellules dendritiques à proximité des cellules tumorales mourantes. En effet, contrairement à l'ATP, l'ANXA1 n'influe pas sur le recrutement des cellules dendritiques mais leur

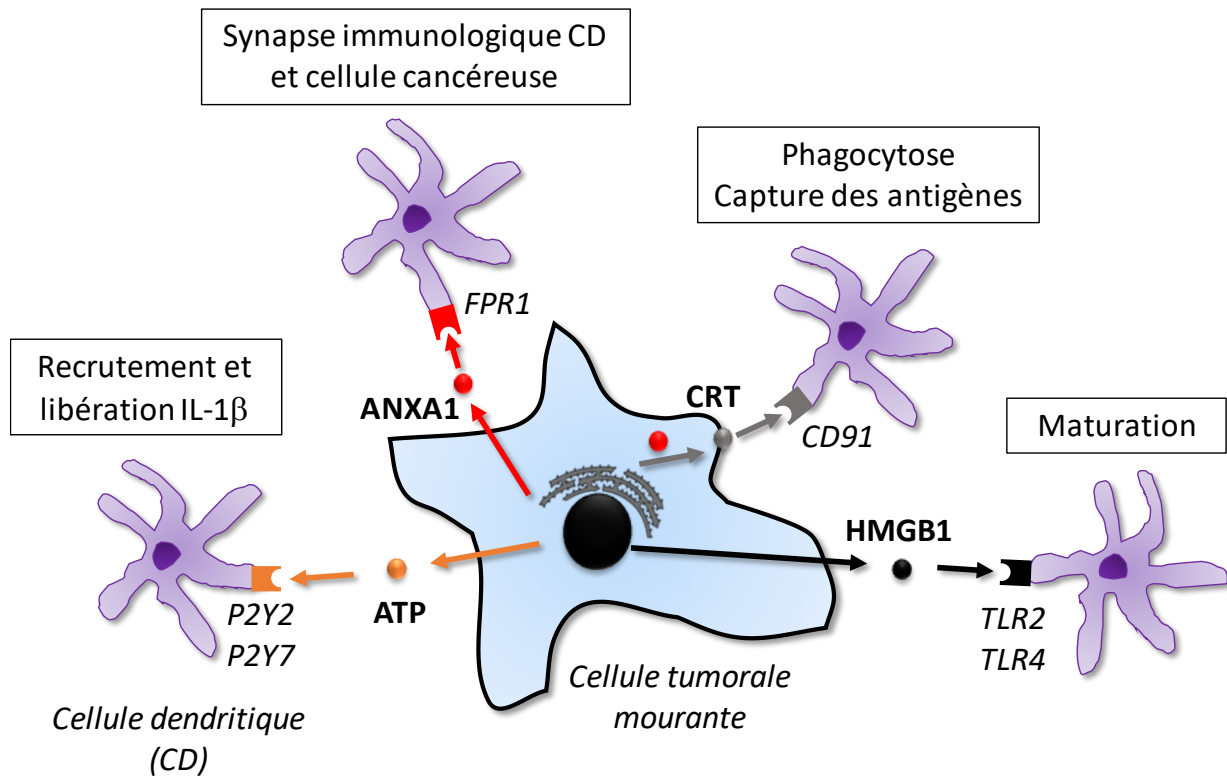


Figure 42 : Libération de signaux de danger par les cellules tumorales suite à l'induction de la mort immunogénique. La mort immunogénique (ICD) peut être induite par différents types de chimiothérapies ou encore par la radiothérapie. Elle nécessite la libération par les cellules tumorales mourantes de signaux de danger appelés DAMP, indispensables à la mise en place d'une réponse immunitaire innée (puis adaptative). Les principaux DAMP identifiés dans le contexte de la mort immunogénique sont l'ATP, la calréticuline (CRT) et HMGB1. Ils ont des origines différentes et agissent sur les cellules dendritiques (CD) grâce à divers types de récepteurs. Plus récemment, l'ANXA1 a également été proposée comme DAMP dans le processus d'ICD. Elle est capable, par l'intermédiaire des récepteurs FPR1, de positionner les CD à proximité des cellules tumorales. Elle est également impliquée dans l'externalisation de la CRT. Une fois activées et matures, les CD sont capables de stimuler les lymphocytes de type CD8+ notamment (via la présentation d'antigène) qui vont par la suite s'attaquer aux cellules tumorales résiduelles, amplifiant ainsi l'action anti-tumorale des traitements inducteurs de l'ICD.

permet d'établir un contact étroit et stable avec les cellules tumorales à éliminer [94]. Une étude plus récente a également confirmé l'importance de l'axe ANXA1/FPR1 dans la réponse anti-tumorale induite par la chimiothérapie sur deux modèles *in vivo* de souris immunocompétentes (fibrosarcome et cancer du poumon). En effet, les souris inoculées avec des cellules cancéreuses invalidées pour l'*Anxa1* et celles n'exprimant pas *Fpr1* présentent un effet anti-tumoral limité de la doxorubicine sur les volumes tumoraux. Ils ont également démontré un nouveau rôle de l'ANXA1 dans l'ICD, indépendant des récepteurs FPR1, en utilisant également des cellules tumorales invalidées pour l'*Anxa1*. Le traitement de ces cellules avec les anthracyclines n'induit pas d'externalisation de la CALR contrairement aux cellules sauvages. L'ANXA1 tumorale est donc non seulement impliquée dans l'interaction des cellules mourantes avec les cellules dendritiques mais également dans l'exposition de la CRT lors de l'ICD [257] (**Figure 42**). De plus, des données récemment publiées par le laboratoire ont mis en évidence l'exposition de l'ANXA1 à la surface des cellules cancéreuses de tumeurs de mélanome murin B16F10 traitées par radiothérapie ciblée avec le ligand de la mélanine ICF01012 radiomarqué à l'iode 131 [258].

2.2- ANXA1 et vascularisation tumorale

Diverses études ont établi un lien entre l'ANXA1 et le système vasculaire des tumeurs. En 2004, Oh et ses collaborateurs ont mis en évidence sur un modèle métastatique d'adénocarcinome mammaire, la présence spécifique d'ANXA1 à la membrane des cellules endothéliales tumorales des poumons. En effet, la protéine n'a pas été détectée au niveau de l'endothélium pulmonaire des souris témoins, ni au niveau des organes sains des souris porteuses de tumeurs (cœur, rein et foie) [259]. Plus récemment, une nouvelle étude s'intéressant à l'expression de l'ANXA1 au niveau vasculaire, a confirmé la présence et l'absence de la protéine au niveau de l'endothélium tumoral et sain respectivement, dans des modèles métastatiques de mélanome B16F10-Luc (injection intraveineuse) et de cancer du sein Pyr230 (injection orthotopique). De plus, les auteurs ont constaté une augmentation de l'expression vasculaire de l'ANXA1 au fur et à mesure de l'envahissement tumoral des poumons par les cellules B16F10-luc [260]. L'analyse de tumeurs humaines a également permis de montrer l'expression spécifique de l'ANXA1 au niveau de l'endothélium des tissus tumoraux dans les cancers du poumon [260], de la prostate [259], du foie [259], du sein [259], de l'ovaire, du foie, de l'estomac et dans le glioblastome [261]. Il a également été montré que les tumeurs mammaires qui expriment fortement l'ANXA1 possèdent une surexpression des gènes impliqués dans l'angiogenèse par rapport aux tumeurs qui ont une faible expression d'ANXA1 [159]. L'ensemble de ces données

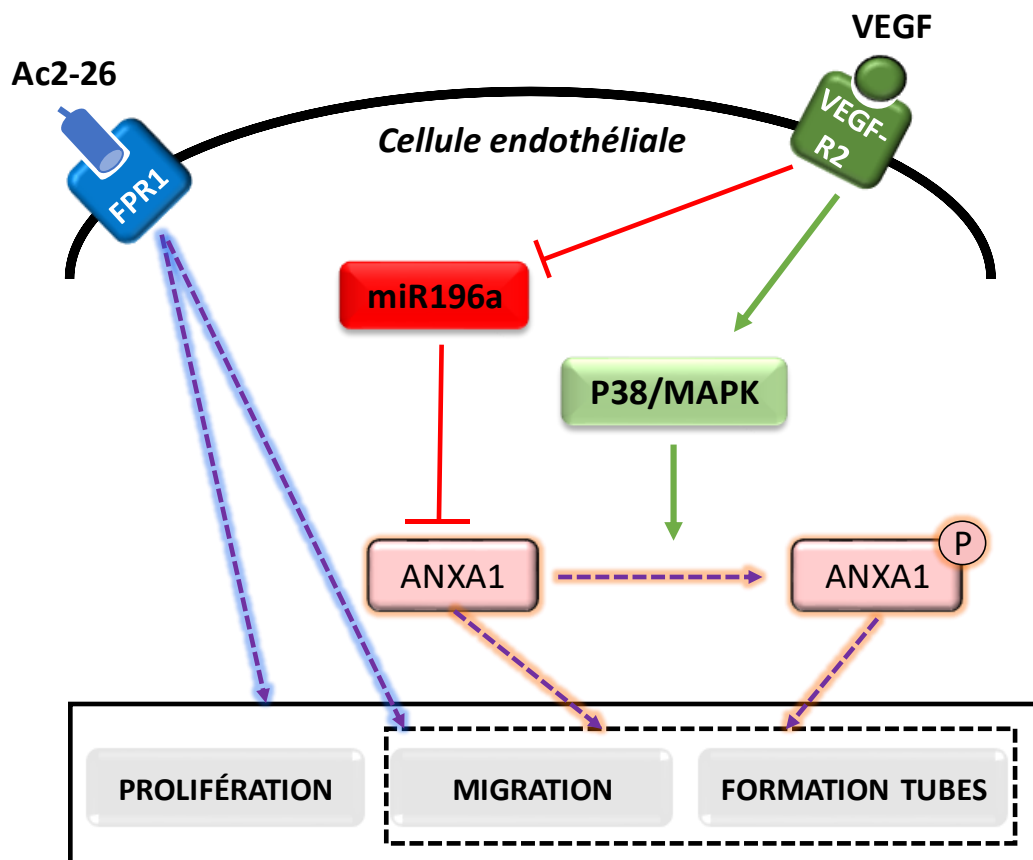


Figure 43 : Implication de l'annexine A1 dans l'angiogenèse. Le VEGF, inducteur principal de l'angiogenèse est capable de réguler indirectement l'expression ainsi que la phosphorylation de l'ANXA1 via l'inhibition de miR196a et l'activation de la voie de signalisation p38/MAPK. L'ANXA1 est quant à elle impliquée dans la migration des cellules endothéliales, notamment de par son rôle dans le remodelage de l'actine, et également dans la formation de tubes. Le traitement des cellules endothéliales avec le peptide Ac2-26 permet de stimuler l'angiogenèse en agissant positivement sur les processus de prolifération, de migration et sur la formation de tubes. L'ANXA1 sous sa forme extracellulaire et/ou intracellulaire est donc capable de moduler l'angiogenèse.

laisse donc penser que l'ANXA1 est induite au niveau du système vasculaire des tumeurs et pourrait donc exercer des fonctions pro-tumorales en modulant l'angiogenèse.

Plusieurs études ont établi un lien entre l'ANXA1 et l'angiogenèse. Dans un premier temps, le VEGF, inducteur principal de l'angiogenèse, est capable de stimuler indirectement l'expression endogène de l'ANXA1 dans les cellules endothéliales HUVEC en réprimant son inhibiteur : miR196a [262]. De plus, le VEGF est également capable d'induire la phosphorylation de l'ANXA1 par l'intermédiaire de la voie de signalisation p38/MAPK [263]. Ces deux types de modulation mènent à l'augmentation des capacités migratoires des cellules endothéliales [262], [263]. En effet, l'ANXA1 est capable de stimuler la formation de lamellipodes en intervenant dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Le VEGF est d'ailleurs capable de favoriser l'association de l'ANXA1 avec l'actine [262]. L'ANXA1 est également nécessaire à la formation de tube vasculaire induite par le VEGF [263]. De façon générale, l'ANXA1 endogène des cellules endothéliales joue donc le rôle de médiateur des effets pro-angiogéniques du VEGF *in vitro*. Plus récemment, Lacerda et ses collaborateurs se sont intéressés à l'effet de l'ANXA1 exogène sur l'angiogenèse en utilisant le peptide Ac2-26 sur des cellules HUVEC. Ils ont montré que le peptide seul, à la manière du VEGF, permet de stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales. De plus, l'association du peptide avec le VEGF potentialise les effets stimulateurs de ce dernier sur la formation de tubes vasculaires *in vitro*. Le peptide est de surcroît capable de stimuler l'angiogenèse *in vivo* [264]. L'ANXA1 exogène extracellulaire peut donc à la fois mimer et potentialiser les effets du VEGF sur l'angiogenèse (**Figure 43**).

L'utilisation de souris invalidées pour l'*Anxa1* a permis de mettre en lumière le lien entre l'ANXA1 du microenvironnement et l'angiogenèse tumorale. En 2009, Yi et ses collaborateurs ont montré que l'absence de l'ANXA1 chez les souris, permet de limiter la pousse tumorale des cellules de mélanome B16. De plus, l'analyse génique des tumeurs développées chez les souris sauvages et invalidées révèle des différences d'expression, notamment au niveau des gènes impliqués dans l'angiogenèse. En effet, les tumeurs des souris n'exprimant pas l'ANXA1 présentent une sur-régulation de gènes anti-angiogéniques comme Timp2 et une sous-régulation de gènes pro-angiogéniques tels que Sphk1 par rapport aux tumeurs des souris contrôles. De plus, les tumeurs des souris invalidées pour l'*Anxa1* présentent une vascularisation réduite comparativement aux souris sauvages. L'ANXA1 présente dans le microenvironnement et ainsi potentiellement au niveau des vaisseaux tumoraux, est donc importante pour l'angiogenèse tumorale [246].

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'ANXA1 est une protéine connue depuis les années 1980 exprimée dans de nombreux tissus. Elle fait partie d'une superfamille regroupant des protéines capables de se lier aux PL membranaires de façon dépendante du calcium. Depuis sa découverte, plusieurs fonctionnalités lui ont été attribuées en lien avec les membranes, le système immunitaire et les cancers notamment. Ses capacités de liaison aux membranes impliquent l'ANXA1 dans les processus d'agrégation membranaire, d'endocytose et d'exocytose. Son rôle dans le processus inflammatoire a été très largement décrit notamment sa capacité à limiter la MTE des neutrophiles. Elle possède également un large spectre d'action au niveau d'autres cellules immunitaires telles que les macrophages et les lymphocytes. L'ANXA1 présente également un grand intérêt diagnostique et thérapeutique en oncologie au vu de sa dérégulation dans de nombreux types de cancers et de ses capacités à moduler la prolifération, la migration et l'invasion *in vitro* et *in vivo*.

L'ANXA1 est régulièrement décrite comme protéine « double face ». En effet, elle peut par exemple à la fois stimuler et inhiber le système immunitaire ainsi que le développement et la progression tumorale. Son action peut dépendre de différents facteurs tels que sa localisation, ses modifications post-traductionnelles (ex : phosphorylation, clivage) ou encore les cellules sur lesquelles elle agit. L'ANXA1 peut être membranaire, cytosolique, nucléaire mais également extracellulaire (membranaire et sécrétée). La forme extracellulaire de l'ANXA1 semble être impliquée dans bon nombre de ses activités notamment sur le système immunitaire et les cellules cancéreuses. De plus, la localisation extracellulaire de l'ANXA1 est souvent associée à un clivage protéolytique de sa partie Nter qui peut limiter son action ou libérer un peptide bioactif (domaine Nter). L'ANXA1 est également exprimée dans beaucoup de types cellulaires différents (épithélial, endothélial, immunitaire) élargissant ainsi son spectre d'action. Il est par exemple bien décrit que la tumeur ne se résume pas aux cellules tumorales mais inclue également les cellules et composants du microenvironnement qui peuvent eux-mêmes exprimer et être régulés par l'ANXA1. Cette dernière peut donc moduler la progression tumorale en agissant à la fois au niveau des cellules tumorales et des cellules stromales.

Ce projet de thèse a donc deux objectifs principaux :

- étudier le rôle de l'ANXA1 extracellulaire dans l'agressivité tumorale en utilisant deux modèles d'étude le CSTN et le mélanome.
- étudier le rôle spécifique de l'ANXA1 tumorale et stromale dans le développement et la progression tumorale du mélanome.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

PARTIE 1 : ÉTUDE DU RÔLE DE L'ANXA1 EXTRACELLULAIRE DANS L'AGRESSIVITÉ TUMORALE

1- Contexte et objectifs

L'ANXA1 est une protéine de la superfamille des annexines. Cette superfamille se compose de douze protéines chez l'homme, capables de se lier aux phospholipides membranaires en présence de calcium. L'ANXA1 est très largement exprimée au sein des cellules humaines. Elle se compose d'un domaine cœur en Cter, très conservé entre les annexines, et d'un domaine Nter plus variable qui lui confère sa spécificité biologique. L'ANXA1 joue un rôle dans de nombreux processus physiopathologiques comme par exemple l'inflammation, la prolifération, la migration ou encore l'invasion [265], [266]. La dérégulation de son expression est retrouvée dans de nombreux types de tumeurs relativement aux tissus sains. L'ANXA1 est par exemple surexprimée dans les cancers du foie [103], [104], du pancréas [101], [102], [134], le cancer colorectal [108], [267] ou encore dans le mélanome [199], [200] et sous-exprimée dans le cancer de la prostate [128], [129], du col de l'utérus [132] ou encore de la thyroïde [133]. Pour plusieurs types de cancer, notamment le cancer du sein, une controverse existe puisque la surexpression [151], [158]–[161] et la sous-expression [152]–[154], [156] ont été rapportées. Malgré de nombreuses études, le rôle de l'ANXA1 dans les cancers n'est donc pas complètement compris et semble être très fortement dépendant des tissus. Des études supplémentaires sur l'expression et le rôle de l'ANXA1 dans les cancers sont donc nécessaires.

Au niveau cellulaire, l'ANXA1 est majoritairement présente dans le cytosol [6]. Cependant elle peut également être retrouvée à l'extérieur des cellules. La localisation extracellulaire comprend à la fois l'interaction avec le feuillet externe de la membrane plasmique et la sécrétion de la protéine dans le milieu environnant. L'action extracellulaire de l'ANXA1 a notamment été décrite dans l'inflammation. En effet, lors de l'adhésion des neutrophiles avec l'endothélium par exemple, la protéine est externalisée et sécrétée [69] afin de limiter leur transmigration [74]. Cette action de l'ANXA1 passe par son interaction avec les récepteurs FPR1 et FPR2 [80], [81]. Certaines cellules tumorales comme les cellules de cancer du pancréas [121], de la prostate [138], du sein [169] ou encore de mélanome [196] sont également capables de sécréter de l'ANXA1. De plus, le traitement

de ces différentes cellules cancéreuses avec le peptide Ac2-26 qui mime le domaine Nter de l'ANXA1 permet de stimuler leur prolifération ainsi que leur agressivité (migration et invasion) par l'intermédiaire des récepteurs FPR [121], [138], [168], [169], [196]. La part extracellulaire de l'ANXA1 semble donc être importante dans la progression tumorale. Cette dernière pourrait agir de deux façons différentes, en stimulant directement les cellules tumorales (autorégulation) ou indirectement en modulant le microenvironnement tumoral.

L'objectif général de ce travail est donc de mieux comprendre le rôle de l'ANXA1 extracellulaire dans l'agressivité tumorale. Pour cela nous avons eu trois sous-objectifs :

- Caractériser l'expression et la localisation de l'ANXA1 dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein triple négatif et de mélanome pour sélectionner des lignées cellulaires pertinentes pour l'analyse du rôle de l'ANXA1 extracellulaire tumorale. Nous avons choisi ces deux modèles sur la base de l'analyse bibliographique et des domaines d'expertises du laboratoire. Si pour le cancer du sein de nombreuses données sont déjà disponibles, peu d'études se sont consacrées à la localisation de l'ANXA1. En ce qui concerne le mélanome, des résultats précédemment publiés par le laboratoire constituent une base pour l'étude de l'ANXA1 extracellulaire dans ce cancer (cf partie 2, paragraphe 3.3).
- Etudier l'effet d'un anticorps bloquant l'ANXA1 (VJ4B6) sur la migration des lignées cellulaires sélectionnées lors de la caractérisation (cancer du sein triple négatif et mélanome), processus en lien direct avec l'agressivité tumorale.
- Examiner l'implication de l'ANXA1 extracellulaire issue des cellules cancéreuses de mélanome dans le développement et la dissémination tumorale *in vivo*. Pour cela nous avons utilisé l'anticorps VJ4B6 afin de bloquer spécifiquement son action. Dans cette étude nous nous sommes focalisés sur le mélanome pour lequel nous disposons d'un modèle syngénique permettant de tenir compte du microenvironnement immunitaire sur lequel peut jouer l'ANXA1 (cf partie 3, paragraphe 2).

Tableau 5 : Conditions de culture des différentes lignées cellulaires de cancer du sein (rose) et de mélanome (bleu), utilisées dans cette étude.

| Type cellulaire | Milieu de culture | SVF | Antibiotique | Autre | |
|-----------------|-------------------|-----|--------------------------|---|-----|
| T47d | RPMI 1640 | 10% | Gentamicine (4 µg/mL) | NON | |
| MCF7 | RPMI 1640 | 10% | | Insuline 10 µg/mL | |
| MCF7luc | DMEM-Glutamax | 10% | | Acides aminés non essentiels (1X) | |
| SUM1315 | Ham's F-12 | 5% | | Insuline 5 µg/mL Hydrocortisone 1 µg/mL Hepes 5 mL EGF 10 ng/mL | |
| SL | Ham's F-12 | 5% | | Insuline 5 µg/mL Hydrocortisone 1 µg/mL Hepes 5 mL EGF 10 ng/mL G418 500 µg/mL | |
| SB | Ham's F-12 | 5% | | Insuline 5 µg/mL Hydrocortisone 1 µg/mL Hepes 5 mL EGF 10 ng/mL G418 500 µg/mL | |
| HCC1937 | RPMI 1640 | 10% | | NON | |
| SUM149 | Ham's F-12 | 5% | | Insuline 5 µg/mL Hydrocortisone 1 µg/mL Hepes 5 mL | |
| MDA-MB-436 | L15 Leibovitz's | 10% | | 16 µg/ml glutathione Insuline 1 µg/mL | |
| MDA-MB-231 | L15 Leibovitz's | 15% | | NON | |
| MDA-MB-231luc | DMEM-Glutamax | 10% | | Acides aminés non essentiels (1X) | |
| SK-MEL-3 | McCoy's 5a | 15% | | Gentamicine (4 µg/mL) | NON |
| SK-MEL-28 | MEM-Glutamax | 10% | | | |
| A375-MA2 | DMEM-Glutamax | 10% | | | |
| B16Bl6 | DMEM-Glutamax | 10% | | | |

2- Matériels et méthodes

2.1- Cellules et réactifs

Les cellules humaines de cancer du sein de type luminal (T47d, MCF7 et MCF7-luc) et TN (HCC1937, MDA-MB-136, MDA-MB-231 et MDA-MB-231-luc), ainsi que la lignée murine 4T1, ont été fournies par l'ATCC (« *American Type Culture Collection* »). Les lignées MCF7-luc et MDA-MB-231-luc qui expriment le gène de la luciférase ont été incluses dans les études dans le but de réaliser à plus long terme des analyses *in vivo* en imagerie optique. La lignée TN SUM1315 a été fournie par Asterand. Les lignées SUM1315-LXSN (SL) et SUM1315-BRCA1 (SB) sont des cellules SUM1315 transfectées de façon stable avec un plasmide LXSN vide ou contenant le gène *BRCA1* respectivement. Les lignées humaines de mélanome (SK-MEL-3, SK-MEL-28 et A375-MA2) ont également été obtenues de l'ATCC et la lignée murine B16BL6 du laboratoire du Professeur Fidler (Université du Texas, Houston, USA). Les conditions de culture de chaque type cellulaire sont récapitulées dans le **Tableau 5**. Les cellules ont toutes été cultivées dans un environnement humide à 37 °C et en présence de 5% de CO₂.

L'ANXA1 recombinante humaine a été produite par le Dr Ruth Rose (Université Queen Mary, Londres, UK). L'anticorps utilisé pour bloquer l'ANXA1 est le VJ4B6 (brevet n°US 9,127,051 B2, 08/09/2015, détenu par le Pr Fulvio D'Acquisto, Université de Roehampton, Londres, UK). Lors de chaque expérimentation avec le VJ4B6, un isotype contrôle (IgG2b, 559530, BD-Pharmingen) a été utilisé.

2.2- Analyse de l'expression de l'ANXA1 par RT-qPCR

Les ARN totaux ont été extraits à partir des cellules en culture en suivant les instructions du fabricant du kit « RNAeasy mini » de Qiagen. Les échantillons ont ensuite été quantifiés et l'intégrité de l'ARN a été vérifiée grâce au bioanalyseur « Agilent 2100 » en utilisant le kit « Agilent RNA 6000 » et en respectant le protocole décrit par le fournisseur (Agilent Technologies). La transcription inverse a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN avec le kit « High-capacity cDNA Reverse Transcription » (Applied Biosystems) suivant le protocole fourni. Elle a été réalisée comme suit : 10 min à 25 °C, 120 min à 37 °C et 5 min à 85 °C. Les ADN complémentaires (ADNc) ainsi synthétisés ont été stockés à -80 °C jusqu'à leur utilisation pour l'analyse de PCR en temps réel. Cette dernière a été conduite grâce à la méthode TaqMan à partir de 25 ng d'ADNc selon les instructions des fournisseurs. Pour les lignées humaines, le gène *UBC* a été utilisé comme contrôle endogène et le gène *Gapdh* pour les lignées murines. Pour les

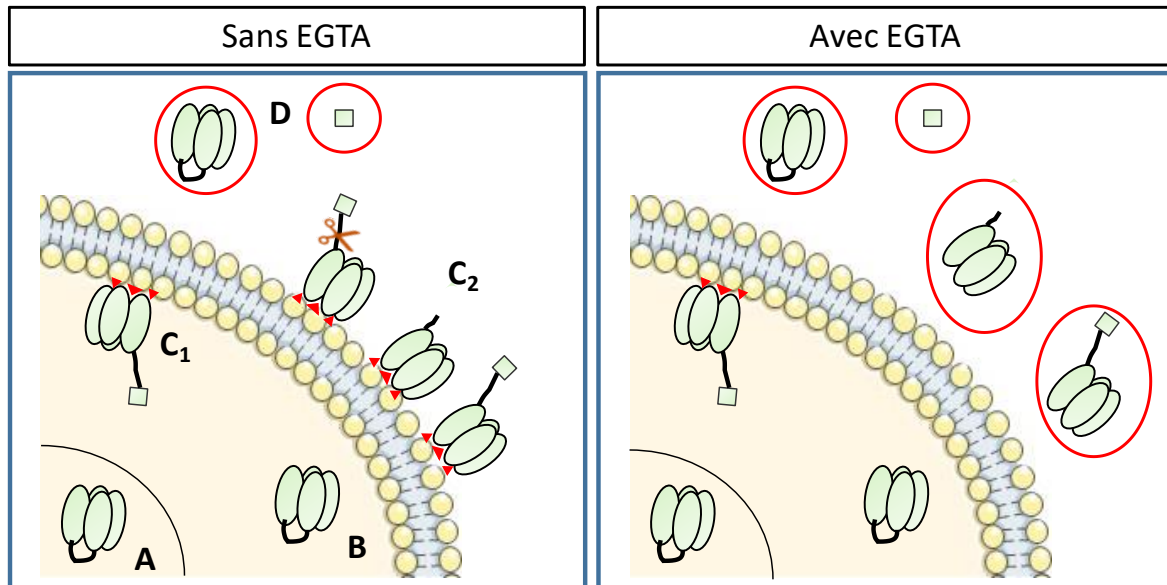


Figure 44 : Analyse de l'annexine A1 extracellulaire avec ou sans EGTA. L'ANXA1 présente différentes localisations cellulaires : nucléaire (A), cytosolique (B) et membranaire (C). Cette dernière peut également être sécrétée par les cellules dans le milieu environnant (D). Lorsqu'on s'intéresse à l'ANXA1 extracellulaire, il faut donc tenir compte à la fois de l'ANXA1 sécrétée (D) mais également de celle présente au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique (C₂). L'ANXA1 sécrétée peut simplement être analysée en récupérant le surnageant des cellules. Par contre, l'ANXA1 membranaire (C₂) est liée aux phospholipides grâce au calcium (triangle rouge), il faut donc ajouter de l'EGTA qui est un chélateur du calcium afin de la récupérer dans les surnageants de culture. Les ciseaux matérialisent le clivage extracellulaire possible de l'ANXA1 et les cercles rouges représentent les différents types d'ANXA1 accessibles avec le surnageant de culture en fonction des deux conditions.

réactions, les références suivantes, comprenant les sondes TaqMan (FAM-MGB pour *ANXA1/Anxa1* et *UBC* et VIC-MGB pour *Gapdh*) ainsi que les amorces, ont été utilisées : Hs00167549_m1 pour *ANXA1*, Mm00440225-m1 pour *Anxa1*, Hs01871556_s1 pour *UBC* et Mm999999915-g1 pour *Gapdh*. La réaction de PCR a été réalisée comme suit: 2 min à 50 °C, 10 min à 95 °C puis 40 cycles de PCR (15 sec à 95 °C et 1 min à 60 °C). Trois répliques expérimentaux ont été réalisés. Les valeurs des cycles seuils (Ct) ont été déterminées en utilisant les logiciels SDS2.4 et « RQ Manager 1.2 ». La quantification relative (QR) a été faite en suivant la méthode des $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{contrôle endogène}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{référence}}$$

$$QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.3- Lyse des cellules et collecte des surnageants de culture

Les cellules ont étéensemencées au nombre de 2×10^5 cellules par puits d'une plaque 6 puits et laissées adhérer pendant 24 h. Après trois lavages dans du DPBS (« *Dulbecco's phosphate-buffered saline* »), le surnageant a été retiré et remplacé par 1 mL d'OptiMEM (31985-047, Invitrogen) contenant 0,9 mM de $CaCl_2$ (C4901, Sigma-Aldrich) supplémenté ou non avec un chélateur du calcium, l'EGTA (E-4378, Sigma-Aldrich). L'EGTA permet de décrocher l'ANXA1 présente au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique (**Figure 44**). Après quelques secondes, le surnageant de culture a été collecté puis centrifugé à 460 xg pendant 8 min à température ambiante. Le surnageant a ensuite été concentré à 4 °C grâce à des concentrateurs (Vivaspin 500 VS0102, Sartorius Stedim) possédant une limite à 10 kDa afin d'atteindre un volume final inférieur à 30 μ L. Chaque échantillon de surnageant issu d'un puits a été utilisé dans son intégralité pour les analyses de western blot. Le tapis cellulaire restant a quant à lui été lysé dans du tampon RIPA contenant 50 mM de Trizma Base (T1503, Sigma-Aldrich) pH7,5 ; 150 mM de NaCl (7647-14-5, Merk), 1% v/v de NP40 (74385, Fluka), 0,5% m/v de deoxycholate de sodium (D6750, Sigma-Aldrich), 0,1% m/v de SDS (19812323, Biosolve) et supplémenté avec des inhibiteurs de phosphatases et de protéases (1X) (78443, ThermoFisher Scientific). Après une centrifugation de 10 min à 10 000 xg à 4 °C permettant d'éliminer les noyaux et les débris cellulaires, la concentration protéique a été estimée grâce à la méthode de Bradford (23200, Invitrogen). Les échantillons ont été préparés de façon à avoir 40 μ g de protéine ou le surnageant issus d'un puits entier, puis analysés par western blot.

2.4- Analyse du niveau protéique de l'ANXA1 par western blot

Les protéines ont été séparées grâce à un gel de type SDS-PAGE 4-15% (456-8084, Bio-Rad) et transférées sur une membrane de nitrocellulose (1620115, Bio-Rad). La membrane a été saturée en protéines pendant 1 h dans du TBS (pH 7,6 ; 200 mM Trizma Base et 1,5 M NaCl) contenant du Tween20 (9005-64-5, FisherScientific) et 5% m/v de lait, puis incubée une nuit à 4 °C en présence de l'anticorps primaire dirigé contre l'ANXA1 (1:10000, 71-3400, Invitrogen). Après trois lavages au TBS-Tween20 (0,1% v/v), la membrane a été incubée pendant 1h30 avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase de Raifort HRP (1:5000, 4050-05, SouthernBiotech). Après trois nouveaux lavages, l'activité HRP a été détectée grâce au substrat « Clarity™ Western ECL » (170-5061, Biorad). Les protéines ont été visualisées à l'aide d'un « ChemiDoc™ MP Imaging System » (Biorad). Grâce à la technologie « Stain-Free », les protéines totales ont été utilisées pour contrôler et corriger la charge protéique déposée initialement dans le gel. Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel « Image Lab » (Biorad).

2.5- Analyse de l'ANXA1 totale et membranaire par cytométrie en flux (CMF)

Un million de cellules a été centrifugé 5 min à 400 xg. Afin de tester la présence de l'ANXA1 dans les cellules et au niveau membranaire, elles ont été ou non perméabilisées (« BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 » 10X, 347692, BD-Bioscience) pendant 10 min à température ambiante puis centrifugées 5 min à 800 xg. Les culots cellulaires ont alors été incubés pendant 30 min à 4 °C dans du milieu de culture contenant 1% m/v de BSA, 5 mM de CaCl₂ (milieu de dilution) et l'anticorps primaire commercial dirigé contre l'ANXA1 (1:500 pour les cellules perméabilisées et 1:100 pour les non perméabilisées, 71-3400, Invitrogen) ou le VJ4B6 (1:250). Les isotypes correspondant ont été utilisés en contrôle. Les cellules ont ensuite été lavées dans du milieu de culture contenant 1% v/v de SVF, 5 mM de CaCl₂ puis incubées 30 min à 4 °C avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à l'AlexaFluor™ 488 (1:2000). Après un nouveau lavage, les cellules ont été incubées avec 4 µg/mL d'iodure de propidium (IP) et analysées au cytomètre (BD LSRII flow cytometer, BD Biosciences, CICS_UCA PARTNER). Le logiciel « FACSDiva data manager v8 » a été utilisé pour déterminer le pourcentage de cellules marquées et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI, « mean fluorescence intensity »).

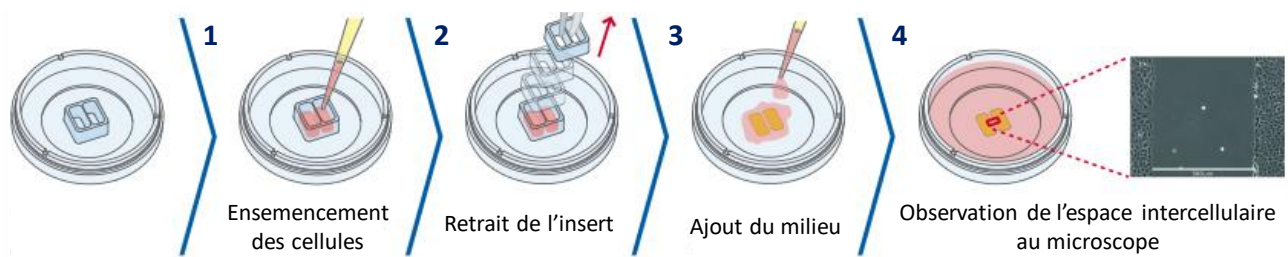


Figure 45 : Les différentes étapes de l'analyse de migration cellulaire *in vitro*. Afin d'analyser les capacités migratoires des différents types cellulaires, nous avons utilisé des inserts de culture individuels commercialisés par IBIDI®. Les cellules sont dans un premier tempsensemencées dans chacune des chambres de l'insert. Une fois les cellules adhérentes arrivées à confluence, l'insert est retiré laissant ainsi un espace intercellulaire d'environ 500 μm . Le milieu de culture contenant ou non différents traitements est ensuite ajouté et la migration est suivie grâce à une observation régulière au microscope de l'envahissement de l'espace intercellulaire.

2.6- Contrôle de la reconnaissance de l'ANXA1 par le VJ4B6 par dot blot

Afin de tester les capacités de reconnaissance du VJ4B6 vis-à-vis de l'ANXA1, différentes quantités d'ANXA1 humaine recombinante ont été déposées sur une membrane de nitrocellulose sous forme de gouttes (2 µL). La membrane a ensuite été incubée pendant 30 min dans du TBS-Tween20 (0.1% v/v) contenant 5% m/v de lait puis avec le VJ4B6 (1:500) ou l'anticorps commercial (1:10000) 71-3400 (Invitrogen). Après trois lavages, la membrane a été incubée avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (1:5000) pendant 30 min. Trois nouveaux lavages ont été réalisés avant l'étape de révélation (voir section western blot).

2.7- Analyse des capacités migratoires des cellules tumorales

Les études de migration ont été réalisées à l'aide de chambres de culture comme expliqué en **Figure 45** (µDish 35 mm, 81176, Ibidi®). Les cellules ont étéensemencées dans chacune des deux chambres de l'insert en silicone à une concentration de 30 000 cell/70 µL pour les MDA-MB-231-luc et les SK-MEL-28 et 50 000 pour les cellules A375-MA2. Environ 24 h plus tard, lorsque la confluence dans les chambres atteint 100%, l'insert est retiré (temps 0 h, t0h), permettant ainsi de créer un espace intercellulaire d'environ 500 µm sans avoir endommagé les cellules. Les tapis cellulaires ont ensuite été lavés avec du DPBS et 2 mL de milieu de culture avec ou sans traitement ont été ajoutés sur les cellules. La migration des cellules a été suivie grâce à la prise de photo régulière de l'espace intercellulaire. La surface de cet espace a été estimée en utilisant le logiciel Fiji et le pourcentage de fermeture a été calculé avec la formule suivante : $[(T0h - T_xh) / T0h] \times 100$ en considérant l'aire de l'espace intercellulaire aux temps donnés.

2.8- Analyse de l'action du VJ4B6 *in vivo*

Cette étude a fait l'objet d'une demande d'autorisation de projet auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (autorisation n°17844) et a été préalablement validée par le Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale Auvergne (C2E2A). La surveillance du bien-être animal a été priorisée sur l'ensemble des procédures réalisées.

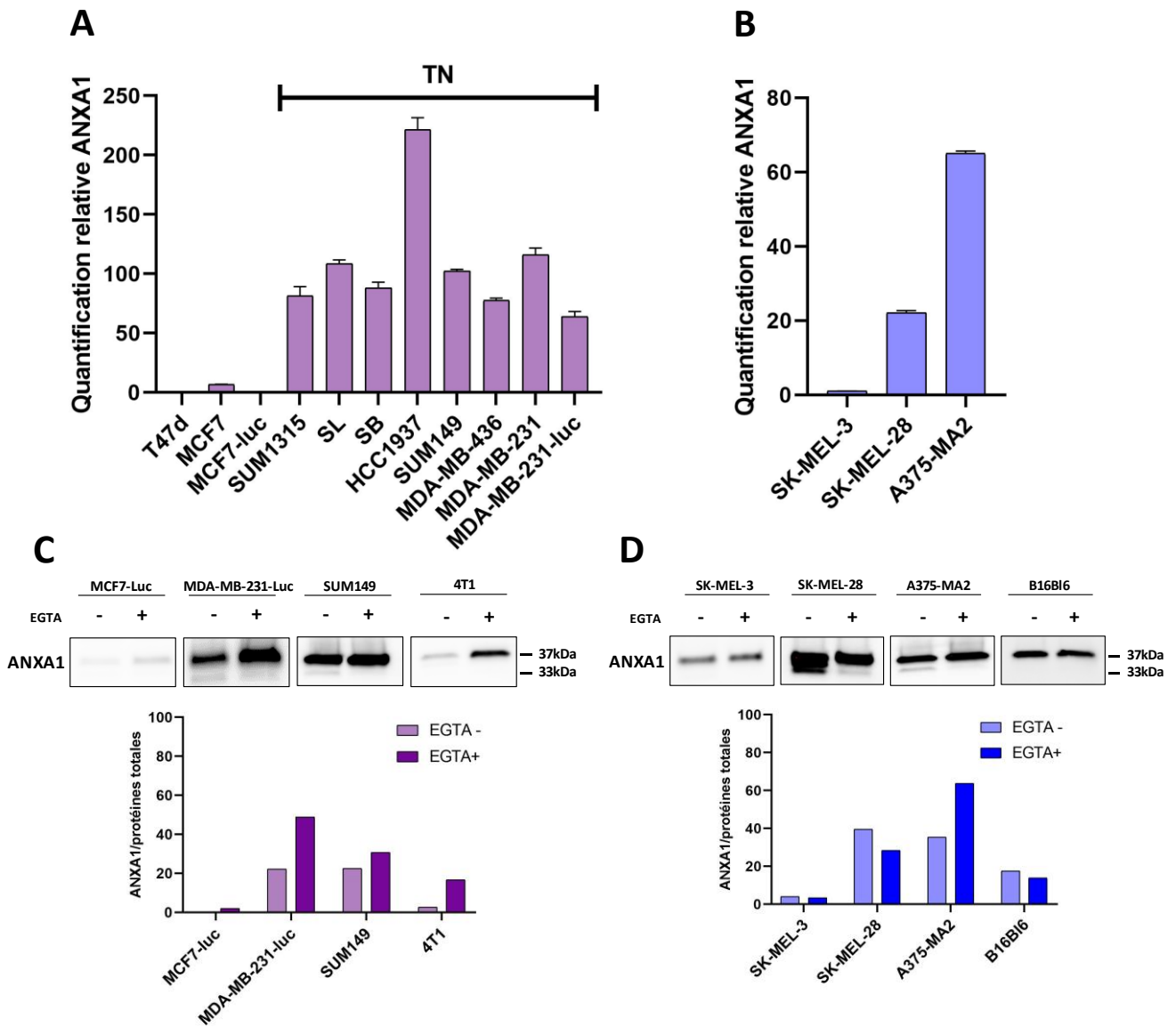


Figure 46 : Expression de l'annexine A1 dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein et de mélanome. L'analyse de l'expression de l'ANXA1 a été réalisée par RT-qPCR sur des lignées humaines de cancer du sein (A) et de mélanome (B). La quantification a été réalisée selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$ en utilisant comme référence la lignée T47d et SK-MEL-3 pour le cancer du sein et le mélanome respectivement. Le niveau protéique de l'ANXA1 dans des lignées humaines et murines de cancer du sein (C) et de mélanome (D) a été analysé par western blot. Les cellules ont été traitées ou non avec de l'EGTA, un chélateur du calcium, avant d'être lysées. Le niveau de l'ANXA1 a été normalisé aux protéines totales grâce à la technologie « stain free » et la quantification correspond à la bande de 37 kDa. TN, triple négatif.

Les souris mâles et femelles C57Bl6/J (WT) ont été fournies par Charles River (n=17) et les souris invalidées pour l'*Anxa1* (KO, « knock-out », n=13) par le Dr Gaëtan Juban (Université Claude Bernard, UMR CNRS 5310, INSERM U1217, Lyon, France). Les cellules murines de mélanome B16Bl6 ont été suspendues dans du DPBS puis injectées (J0) en sous-cutané au niveau du flanc droit des souris (2×10^5). La veille de l'injection des cellules (J-1) et à J6 et J13, les souris ont été traitées en intra-péritonéal avec du NaCl (WT n=6, KO n=5), l'isotype contrôle (2 µg/mL, WT n=5, KO n=4) ou le VJ4B6 (2 µg/mL, WT n=6, KO n=4). Des injections intra-tumorales de NaCl ont été réalisées 9 et 14 jours après l'injection des cellules afin de favoriser la formation de métastases pulmonaires. Tout au long de l'étude, le poids des souris a été contrôlé trois fois par semaine tout comme le volume tumoral. Ce dernier a été calculé avec la formule suivante : $(L \times l^2) / 2$ avec L et l représentant respectivement la longueur et la largeur en millimètre. Les animaux ont été mis à mort à J19 par dislocation cervicale. Les métastases pulmonaires ont été comptées à l'aide d'une loupe binoculaire après rinçage des poumons dans du DPBS.

3- Résultats

3.1- Caractérisation de l'expression et de la localisation de l'ANXA1

3.1.1- Expression de l'ANXA1 dans différentes lignées cellulaires

Afin de déterminer le niveau d'expression relatif de l'ANXA1 dans les lignées cellulaires de CS et de mélanome, nous avons réalisé des études de RT-qPCR. Pour le cancer du sein nous avons analysé des lignées humaines luminales T74D et MCF7/MCF7-luc (expression des récepteurs hormonaux) ainsi que plusieurs lignées TN. Pour le mélanome nous avons choisi la lignée humaine peu invasive SK-MEL-3 et les lignées invasives SK-MEL-28 et A375-MA2 [202], [268], [269]. On observe très nettement une surexpression de l'ANXA1 dans les lignées TN par rapport aux lignées luminales (**Figure 46A**). Pour le mélanome, il est notable que les lignées présentant des capacités invasives importantes SK-MEL-28 et A375-MA2 expriment plus d'ANXA1 que la lignée SK-MEL-3 (**Figure 46B**). Nous avons également étudié deux types cellulaires murins, les cellules TN 4T1 pour le CS et B16Bl6 pour le mélanome. Pour la lignée 4T1, le Ct est plutôt similaire aux lignées TN alors que pour la lignée B16Bl6 la valeur du Ct est plus proche de celui de la lignée SK-MEL-3.

Tableau 6 : Analyse de l'annexine A1 totale et membranaire par cytométrie en flux.

| Lignées cellulaires | ANXA1 | |
|---------------------|--------------|-------------|
| | Totale | Membranaire |
| MCF7-luc | 83,4% (705) | 54,3% (160) |
| MDA-MB-231-luc | 95,1% (1987) | 14,4% (143) |
| SUM149 | 69,4 (2337) | 77,0% (231) |
| 4T1 | 16,3% (154) | 1,3% (154) |
| SK-MEL-3 | 99,7% (933) | 13,5% (140) |
| SK-MEL-28 | 98,4% (967) | 5,4% (166) |
| A375-MA2 | 99,7% (2084) | 23,4% (152) |
| B16BI6 | 98,4% (815) | 4,8% (136) |

Pourcentage de cellules marquées (*intensité de fluorescence moyenne, MFI*)

Nous avons ensuite comparé ces données d'expression au niveau protéique de l'ANXA1. Pour cela, les lysats cellulaires ont été analysés par western blot. Pour les lignées de CS, on retrouve bien un niveau protéique plus élevé chez les cellules TN par rapport à la lignée non TN MCF7-luc. Cependant, le niveau d'ANXA1 pour la lignée murine 4T1 est très faible. L'anticorps utilisé possède peut-être une réactivité plus élevée pour la protéine humaine que pour la protéine murine (**Figure 46C**). En ce qui concerne les lignées de mélanome, la lignée peu invasive SK-MEL-3 présente un faible niveau de l'ANXA1 par rapport aux lignées SK-MEL-28 et A375-MA2. La lignée murine B16Bl6 présente quant à elle un niveau plutôt intermédiaire (**Figure 46D**). On peut également noter, notamment pour les cellules SK-MEL-28 et A375-MA2, la présence de la forme clivée de l'ANXA1 à 33kDa.

3.1.2- Mise en évidence de l'ANXA1 extracellulaire (membranaire et sécrétée)

Dans cette étude, notre objectif principal est de mieux comprendre l'implication de l'ANXA1 extracellulaire dans l'agressivité tumorale. Pour cela nous avons donc analysé par différentes techniques l'ANXA1 extracellulaire membranaire et sécrétée.

Dans un premier temps nous avons réalisé une étude de cytométrie en flux sur des cellules perméabilisées et non perméabilisées pour détecter respectivement l'ANXA1 intracellulaire et membranaire, et l'ANXA1 membranaire. Les résultats présentés dans le **Tableau 6** regroupent les pourcentages de cellules marquées ainsi que les MFI. Toutes les lignées de cancer du sein (lignes roses) présentent un pourcentage de cellules positives à l'ANXA1 important (supérieur à 69%) sauf la lignée murine 4T1 (inférieur à 20%). Cependant les deux lignées humaines TN MDA-MB-231-luc et SUM149 ont une MFI environ trois fois supérieure à la lignée non TN MCF7-luc. Pour les lignées de mélanome (lignes bleues), le pourcentage de cellules positives pour l'ANXA1 est presque de 100%. Par contre, la lignée A375-MA2 possède une MFI plus de deux fois supérieure aux autres lignées. Ce résultat s'accorde avec les données de RT-qPCR qui montraient que la lignée A375-MA2 exprime très fortement l'ANXA1 par rapport aux autres cellules de mélanome qui présentent des MFI faibles (**Figure 46B**).

L'analyse des cellules non perméabilisées montre que de façon globale et pour presque toutes les lignées (sauf SUM149) les pourcentages de cellules positives pour l'ANXA1 membranaire ainsi que les MFI sont bien plus faibles que sur les cellules perméabilisées (**Tableau 6**). Contrairement aux précédentes analyses, l'étude spécifique de l'ANXA1 membranaire ne semble pas permettre de discriminer les cellules TN des non TN, ni les mélanomes plus ou moins invasifs. Pour le cancer du sein,

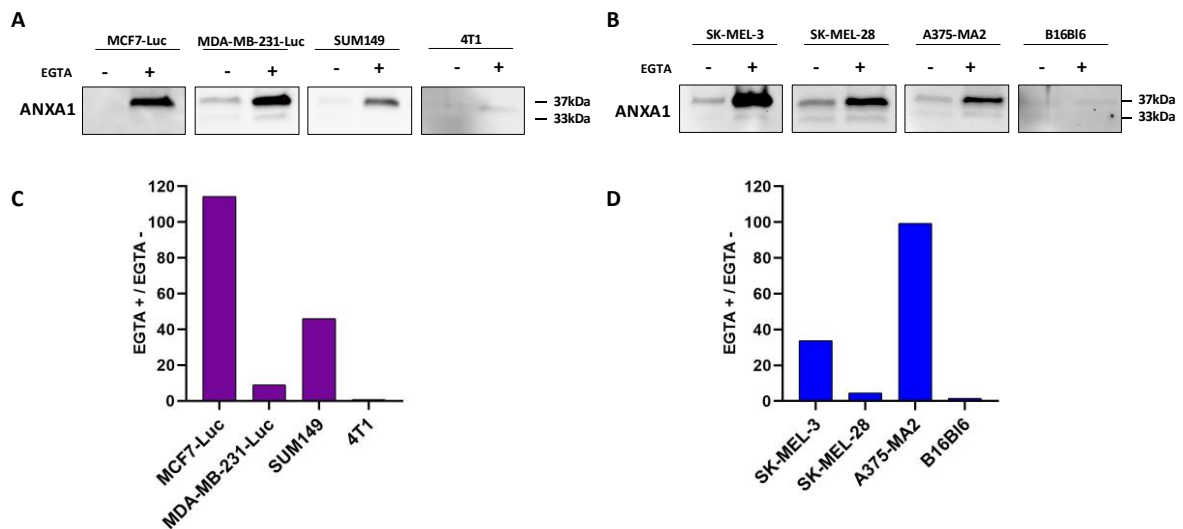


Figure 47 : Sécrétion de l'annexine A1 par différentes lignées cellulaires de cancer du sein et de mélanome. Les surnageants de culture de cellules de cancer du sein (A&C) et de mélanome (B&D) ont été étudiés par western blot afin d'identifier l'ANXA1 sécrétées par ces dernières. L'ajout d'EGTA, un chélateur du calcium permet également de récupérer l'ANXA1 fixée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique de façon dépendante du calcium. L'équivalent d'un puits d'une plaque 6 puits de cellules a été déposé pour chaque type cellulaire. (C&D) Le ratio de la quantité d'ANXA1 (37 kDa) avec et sans EGTA a été calculé afin d'estimer la quantité d'ANXA1 présente à la membrane. Plus le ratio EGTA+/EGTA- est élevé plus l'EGTA a décroché d'ANXA1 membranaire.

ce sont les lignées SUM149 (77,0%, MFI 231) et MCF7-luc (54,3%, MFI 160) qui possèdent le plus d'ANXA1 membranaire et pour le mélanome les lignées A375-MA2 (23,4%, MFI 152) et SK-MEL-3 (13,5%, MFI 140).

Nous nous sommes dans un second temps consacrés à l'étude de l'ANXA1 sécrétée. Pour cela, les surnageants de culture ont été analysés par western blot (**Figure 47**). Pour les cellules de cancer du sein, seule la lignée MDA-MB-231-luc (TN) est capable de rapidement libérer dans le surnageant une quantité détectable d'ANXA1 (**Figure 47A**). Les cellules humaines de mélanomes sont quant à elles capables de sécréter de l'ANXA1 (**Figure 47B**). Le traitement des cellules avec l'EGTA permet de décrocher l'ANXA1 du feuillet externe de la membrane plasmique et ainsi d'avoir accès à la totalité de l'ANXA1 extracellulaire (membranaire et sécrétée). Pour toutes les cellules humaines, l'EGTA permet d'augmenter de façon importante la détection de l'ANXA1 dans les surnageants (**Figure 47A&B**). Le ratio EGTA+/EGTA- permet d'estimer la quantité d'ANXA1 présente au niveau de la membrane. Les données de ratios sont cohérentes avec l'analyse CMF de l'ANXA1 présente à la membrane puisque les lignées MCF7-luc (114,3) et SUM149 (46,0) et A375-MA2 (99,2) et SK-MEL-3 (33,8) ont les ratios les plus élevés pour le cancer du sein et le mélanome respectivement (**Figure 47C&D**). On peut de plus noter chez certaines lignées, notamment en présence d'EGTA, l'apparition légère de la forme clivée de l'ANXA1 dans les surnageants de culture (forme à 33 kDa) (**Figure 47A&B**). L'EGTA a également été utilisé pour l'analyse des lysats cellulaires. Cependant, contrairement à ce que l'on attendait, l'ajout d'EGTA n'entraîne pas systématiquement une diminution de la détection de l'ANXA1 (**Figure 46C&D**). On peut émettre l'hypothèse qu'en éliminant l'ANXA1 liée au feuillet externe de la membrane plasmique, l'EGTA déclenche un processus de compensation, menant à une sur-régulation de la protéine. De plus, pour certains types cellulaires, particulièrement les lignées SUM149, SK-MEL-28 et A375-MA2, l'ajout du chélateur diminue fortement la détection de la forme clivée de l'ANXA1, suggérant que cette dernière est majoritairement présente au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique des cellules.

3.2- Blocage de l'ANXA1 extracellulaire par un anticorps spécifique : effet sur la migration *in vitro*

Afin de tester l'implication de l'ANXA1 dans la migration cellulaire, qui constitue une des caractéristiques d'agressivité des tumeurs, nous avons utilisé un anticorps bloquant : le VJ4B6. Nous

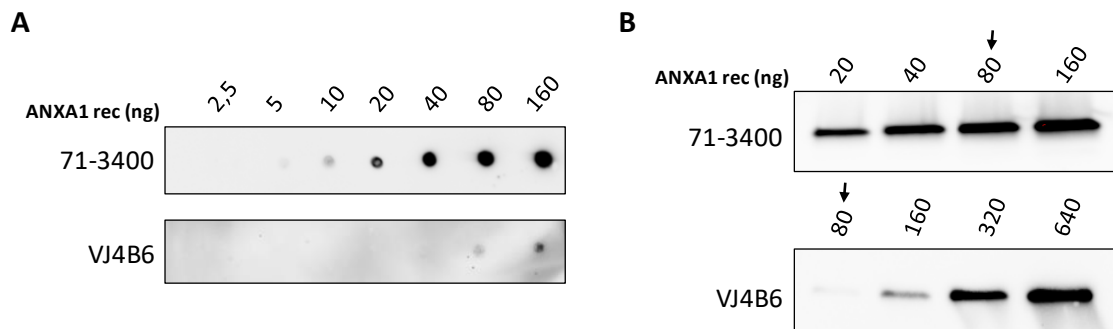


Figure 48 : Reconnaissance de l'annexine A1 recombinante humaine par le VJ4B6. Afin de tester les capacités de reconnaissance du VJ4B6 vis-à-vis de l'ANXA1, un dot blot (**A**) et un western blot (**B**) ont été réalisés avec des quantités croissantes d'ANXA1 recombinante. Le VJ4B6 a été comparé à un anticorps commercial de chez Invitrogen (71-3400).

Tableau 7 : Reconnaissance de l'annexine A1 totale et membranaire par le VJ4B6 en cytométrie en flux.

| Lignées cellulaires | 71-3400 | | VJ4B6 | |
|---------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| | Totale | Membranaire | Totale | Membranaire |
| MCF7-luc | 83,4% (705) | 54,3% (160) | 76,9% (341) | 1,1% (257) |
| MDA-MB-231-luc | 95,1% (1987) | 14,4% (143) | 84,9% (623) | 4,0% (147) |
| SUM149 | 69,4 (2337) | 77,0% (231) | 73,0% (487) | 1,5% (331) |
| 4T1 | 16,3% (154) | 1,3% (154) | 4,3% (268) | 0,5% (213) |
| SK-MEL-3 | 99,7% (933) | 13,5% (140) | 59,0% (279) | 0,5% (295) |
| SK-MEL-28 | 98,4% (967) | 5,4% (166) | 65,5% (877) | 2,6% (151) |
| A375-MA2 | 99,7% (2084) | 23,4% (152) | 97,6% (1215) | 1,8% (314) |
| B16Bl6 | 98,4% (815) | 4,8% (136) | 39,5% (244) | 0,3% (144) |

Pourcentage de cellules marquées (*intensité de fluorescence moyenne, MFI*)

avons réalisé cette étude sur les lignées MDA-MB-231-luc et SK-MEL-28 pour le CSTN et le mélanome respectivement. Ces deux lignées ont été sélectionnées sur deux critères principaux : la présence d'ANXA1 extracellulaire à la fois membranaire et sécrétée ainsi que leurs capacités migratoires. Au préalable, nous avons dans un premier temps réalisé quelques tests de reconnaissance de l'ANXA1 par le VJ4B6.

3.2.1- Validation du VJ4B6 pour les lignées de cancer du sein triple négatif et de mélanome

Le VJ4B6 est un anticorps monoclonal issu d'un hybridome de souris. Il est dirigé contre l'ANXA1 humaine et a été développé et breveté par les Professeurs Fulvio D'Acquisto et Mauro Perretti. Cet isotype IgG2b est également humanisé. Dans cette étude la forme non humanisée a été utilisée. Il est produit par l'intermédiaire d'un hybridome formé à partir de lymphocytes de souris et d'un myélome murin. Des études en CMF ont permis de valider les capacités de reconnaissance du VJ4B6 sur des cellules immunitaires humaines et murines perméabilisées. Les capacités de blocage de l'ANXA1 ont également été démontrées sur des lymphocytes. En effet, le VJ4B6 permet bien de bloquer leur prolifération et leur activation à 50 et 500 ng/mL [270] (**Annexe 2&3**).

Afin de compléter les données déjà disponibles dans le brevet du VJ4B6, nous avons réalisé des expériences complémentaires afin de comparer ses capacités de reconnaissance à un anticorps commercial (71-3400, Invitrogen). Dans un premier temps, nous avons réalisé un dot blot (**Figure 48A**) et un western blot (**Figure 48B**) à l'aide de différentes quantités d'ANXA1 recombinante humaine. Cette étude nous a permis de montrer que le VJ4B6 est bien capable de détecter l'ANXA1 mais que des quantités plus importantes sont nécessaires par rapport à l'anticorps commercial polyclonal (**Figure 48**). Les capacités de reconnaissance de l'ANXA1 par le VJ4B6 au niveau des cellules tumorales ont ensuite été analysées par CMF (**Tableau 7**). En ce qui concerne les cellules perméabilisées, les pourcentages de cellules positives pour l'ANXA1 et les MFI sont globalement plus faibles lorsque la détection est réalisée avec le VJ4B6 relativement à l'anticorps commercial. Cependant avec les deux types d'anticorps, ce sont les lignées TN MDA-MB-231-luc et SUM149 et la lignée de mélanome A375-MA2 qui présentent les MFI les plus élevées. Pour le marquage membranaire, le VJ4B6 détecte moins de cellules marquées mais les MFI sont relativement similaires voire supérieures à celles obtenues avec l'anticorps commercial. On peut suggérer que le VJ4B6 serait plus spécifique puisqu'il détecte moins de cellules mais un signal ANXA1 plus important.

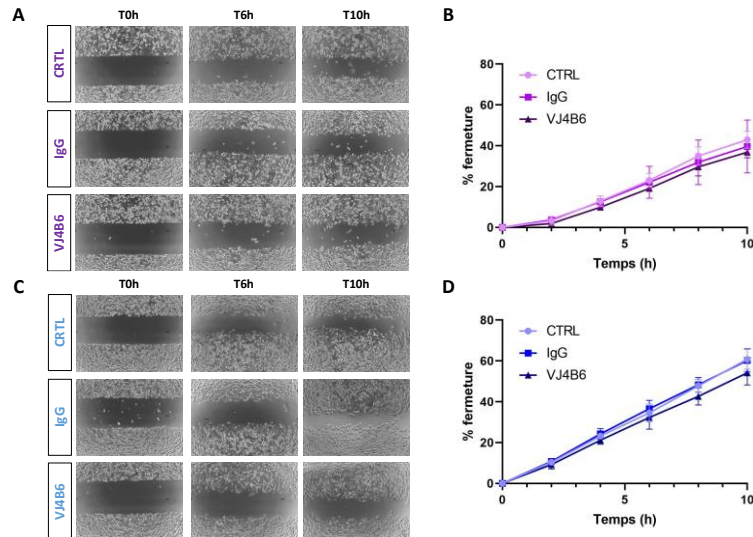


Figure 49 : L'anticorps bloquant VJ4B6 à 50 ng/mL n'influe pas sur la migration cellulaire. Les cellules de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231-luc (A&B) et de mélanome SK-MEL-28 (C&D) ont été traitées avec du milieu de culture seul (CTRL) ou contenant un IgG contrôle ou l'anticorps bloquant de l'ANXA1 : VJ4B6 à 50 ng/mL. (A&C) Des photos ont été prises à différents temps afin de suivre les capacités migratoires des cellules. (B&D) Le pourcentage de fermeture de l'espace intercellulaire a été calculé relativement au temps 0 (T0h) qui correspond au moment du traitement. Les données présentent la moyenne \pm écart-type et sont représentatives de deux expériences indépendantes pour la lignée MDA-MB-231-luc et trois pour SK-MEL-28.

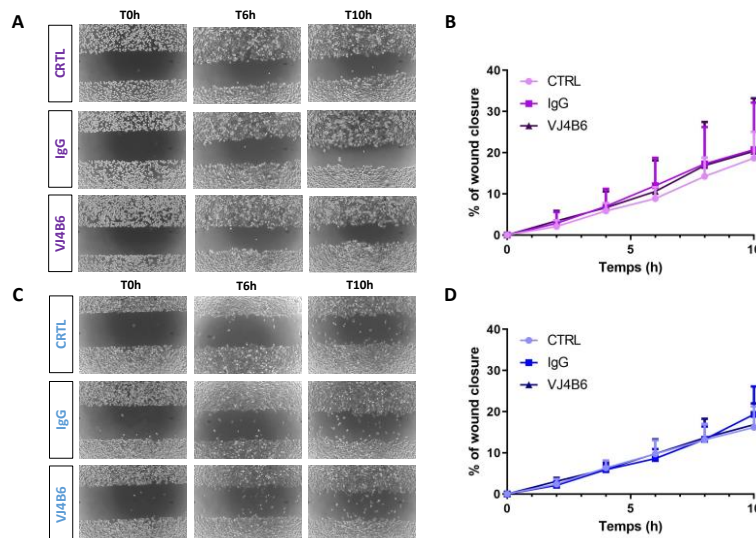


Figure 50 : L'anticorps bloquant VJ4B6 à 20 μ g/mL n'influe pas sur la migration cellulaire. Les cellules de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231-luc (A&B) et de mélanome A375-MA2 (C&D) ont été traitées avec du milieu de culture seul (CTRL) ou contenant un IgG contrôle ou l'anticorps bloquant de l'ANXA1 : VJ4B6 à 20 μ g/mL. (A&C) Des photos ont été prises à différents temps afin de suivre les capacités migratoires des cellules. (B&D) Le pourcentage de fermeture de l'espace intercellulaire a été calculé relativement au temps 0 (T0h) qui correspond au moment du traitement. Les données présentent la moyenne \pm écart-type et sont représentatives de deux expériences indépendantes pour la lignée MDA-MB-231-luc et trois pour A375-MA2.

3.2.2- Absence d'efficacité du VJ4B6 sur la migration *in vitro*

Pour tester l'implication de l'ANXA1 dans les capacités migratoires des cellules MDA-MB-231-luc et SK-MEL-28, nous avons projeté de bloquer son action grâce au VJ4B6. Les cellules ont été traitées avec 50 ng/mL de VJ4B6 au moment de la création de l'espace intercellulaire (retrait des inserts) puis laissées migrer pendant 10 h. Pour les deux lignées cellulaires, l'évolution de la migration est similaire dans les trois conditions d'étude : contrôle milieu de culture (CTRL), IgG contrôle (IgG) et VJ4B6 (**Figure 49**).

En utilisant le VJ4B6 à 50 ng/mL nous nous sommes placés à une concentration permettant d'obtenir un effet inhibiteur de l'anticorps sur la prolifération et la libération d'IL-12 des lymphocytes [270]. L'anticorps n'ayant aucun effet sur la migration des cellules, nous nous sommes interrogés sur la concentration à appliquer. En effet, les concentrations utilisées dans le brevet sont appliquées à des cellules immunitaires, il est donc possible qu'elles ne conviennent pas dans le cadre de cellules cancéreuses. De plus nous avons vu précédemment que la part extracellulaire de l'ANXA1 dans nos différentes cellules tumorales est relativement faible par rapport à l'ANXA1 totale. Les données de la littérature concernant le ciblage et le blocage de protéines membranaires comme HER2 et tétraspanine 8 (Tspan8) à l'aide d'anticorps emploient en effet des concentrations bien plus élevées. Pour les expérimentations *in vitro* de type migration et invasion, les anticorps bloquants ciblant HER2 sont utilisés à 10 µg/mL [271]–[273] et Tspan8 à 15-20 µg/mL [274], [275]. Une nouvelle expérience a donc été réalisée avec le VJ4B6 à 20 µg/mL. Nous avons également choisi d'utiliser la lignée A375-MA2 connue pour son agressivité *in vivo* [269]. Nos précédentes analyses ont de plus permis de montrer que cette lignée cellulaire exprime fortement l'ANXA1 (**Figure 46B**), et nous avons mis en évidence la présence importante de la protéine au niveau de la membrane externe (**Tableau 6**). L'ANXA1 se lie aux membranes de façon calcium dépendante et la présence de ce calcium lui permet d'acquérir une conformation plus « active » (domaine Nter libre) [21], [22]. Il est donc possible que la reconnaissance par le VJ4B6 soit facilitée au niveau de la membrane. Dans les conditions utilisées, le VJ4B6 ne modifie pas la migration cellulaire des lignées A375-MA2 et MDA-MB-231-luc (**Figure 50**). On peut noter que pour cette expérience, la migration des MDA-MB-231-luc est plus lente que pour l'analyse précédente (**Figure 49**). Ceci peut s'expliquer par le fait que la confluence à T0h est légèrement inférieure par rapport à l'analyse avec 50 ng/mL de VJ4B6.

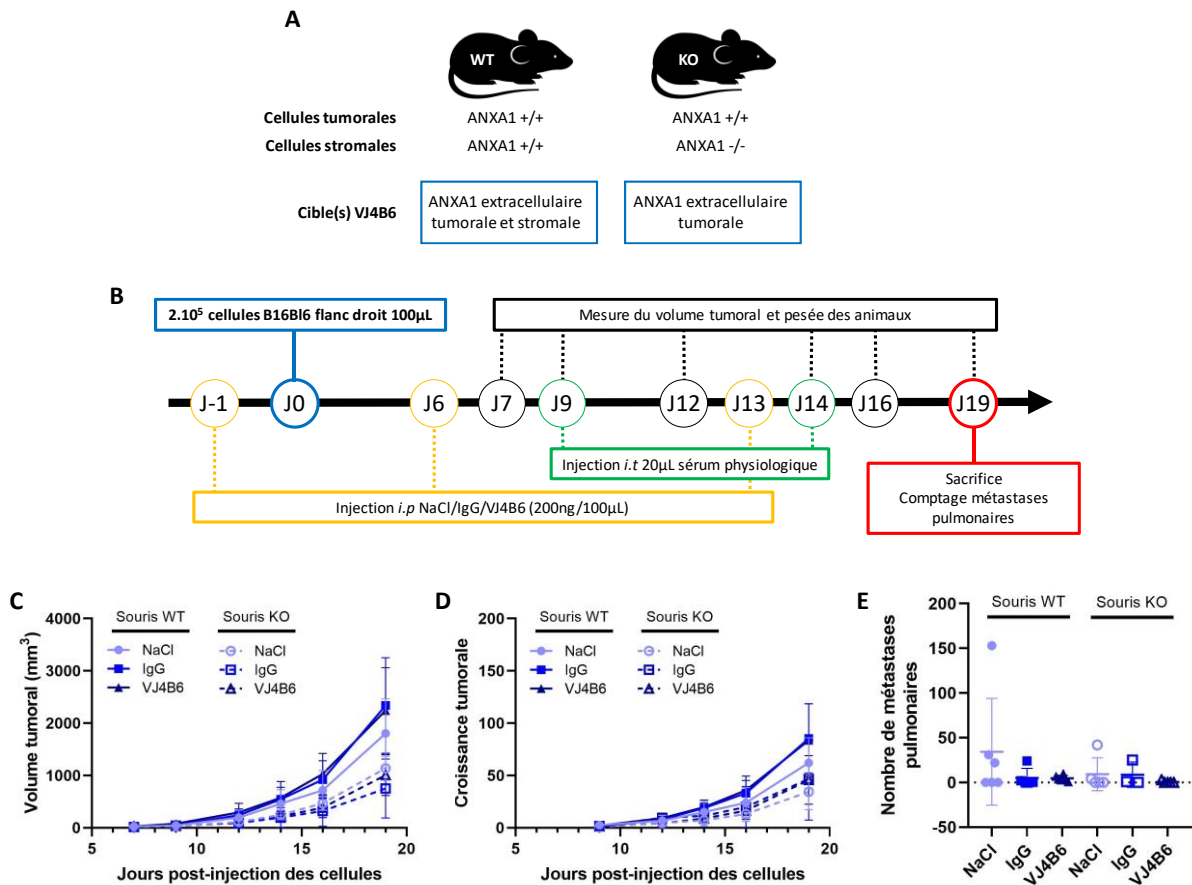


Figure 51 : Le blocage de l'annexine A1 avec le VJ4B6 n'influe pas sur le développement et la progression tumorale des cellules de mélanome murin B16Bl6. **(A)** Chez les souris WT (ANXA1 +/+), le VJ4B6 va avoir pour cible à la fois l'ANXA1 extracellulaire issu des cellules tumorales et des cellules stromales. Cependant, chez les souris KO (ANXA1 -/-), les cellules stromales n'expriment pas l'ANXA1. Le VJ4B6 va donc cibler spécifiquement l'ANXA1 extracellulaire issue des cellules tumorales. **(B)** Les souris C57Bl6/J sauvages (WT, n=17) ou invalidées pour l'*Anxa1* (KO, n=13) ont été injectées en sous-cutané avec les cellules B16Bl6. Le suivi du volume tumoral et du poids des souris a été réalisé trois fois par semaine. Les injections des différents traitements NaCl (WT n=6, KO n=5), IgG contrôle (2 µg/mL, WT n=5, KO n=4) et VJ4B6 (2 µg/mL, WT n=6, KO n=4) ont été réalisées en intra-péritonéal la veille de l'injection des cellules tumorales puis une fois par semaine. Afin de favoriser la formation de métastases, des injections intra-tumorales de sérum physiologique ont été réalisées 9 et 14 jours après l'injection des cellules. Les souris ont été sacrifiées 19 jours après l'injection des cellules. **(C)** Le volume tumoral ainsi que la croissance tumorale **(D)** ont été déterminés comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les lignes pleines correspondent aux souris WT et les pointillées au souris KO. **(E)** Lors du sacrifice, les métastases pulmonaires ont été comptées à l'aide d'une loupe binoculaire pour chacun des groupes de souris. Les données représentent la moyenne ± écart-type.

3.3- Absence d'efficacité du VJ4B6 sur la croissance tumorale

L'environnement tumoral est très complexe et ne se résume pas aux cellules tumorales. En effet, ces dernières sont en interaction permanente avec leur microenvironnement qui peut influencer leur comportement et leur évolution. Nous avons donc également étudié le rôle de l'ANXA1 tumorale extracellulaire *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé des souris invalidées pour l'*Anxa1* (KO) fournies par le Dr Gaëtan Juban. L'utilisation de ces animaux KO permet de s'affranchir de l'ANXA1 extracellulaire pouvant provenir des cellules du microenvironnement, notamment les cellules immunitaires. Des souris sauvages (WT) ont également été utilisées afin de cibler, dans ce cas, l'ensemble de l'ANXA1 extracellulaire présente au niveau de la tumeur (**Figure 51A**). Pour cette étude nous avons utilisé un modèle syngénique afin de tenir compte de la composante immunitaire au cours de l'expérimentation. En effet le lien entre ANXA1 et immunité est bien connu, tout comme l'influence du microenvironnement immunitaire sur la croissance et l'agressivité tumorale (cf partie 3, paragraphe 1.1). Les cellules B16Bl6 murine ont donc été utilisées pour cette analyse. Le protocole d'étude suivi est représenté en **Figure 51B**. Le volume ainsi que la croissance tumorale ont été suivis pour chacun des groupes (NaCl, IgG, VJ4B6). Quel que soit les groupes, l'anticorps bloquant ne semble pas affecter l'évolution des volumes tumoraux, ni la croissance tumorale (**Figure 51C&D**). De façon similaire, le VJ4B6 n'agit pas sur la formation des métastases pulmonaires (**Figure 51E**). L'ANXA1 extracellulaire ne semble donc pas être impliquée dans la progression et la dissémination du mélanome ou le VJ4B6 n'est pas suffisamment efficace pour bloquer l'action de l'ANXA1 dans ces conditions d'études. Cependant, il est intéressant de remarquer que les volumes tumoraux des souris KO sont, pour les trois groupes de traitements, inférieurs à ceux des souris WT. Les croissances tumorales sont également ralenties chez les souris KO (**Figure 51C&D**).

4- Discussion

Plusieurs études ont permis de montrer que l'ANXA1 est dérégulée dans de nombreux types de cancers et que cette protéine est impliquée dans les processus de prolifération, de migration ou encore d'invasion. L'utilisation d'un peptide mimant la partie Nter de l'ANXA1 a permis de montrer que l'apport exogène de la protéine dans le milieu environnant permet de stimuler les cellules tumorales. L'observation que certaines cellules tumorales sont capables de sécréter de l'ANXA1 laisse penser que cette protéine, une fois externalisée, pourrait également favoriser le développement et

l'agressivité tumorale. Notre objectif a donc été d'évaluer l'influence de cette ANXA1 extracellulaire tumorale sur la migration *in vitro* et également sur le développement et la dissémination tumorale *in vivo*.

Dans un premier temps, l'expression ainsi que la localisation cellulaire de l'ANXA1 ont été étudiées par différentes techniques dans des cellules de CS et de mélanome (**Figure 46&47, Tableau 6**). Ceci nous a permis de montrer que l'expression de l'ANXA1 est variable entre les lignées d'un même type de cancer, mais également que certaines lignées cellulaires présentent de l'ANXA1 extracellulaire sous forme membranaire et/ou sécrétée.

Nous avons retrouvé une surexpression de l'ANXA1 dans les lignées cellulaires TN humaines relativement aux non TN (**Figure 46A&C, Tableau 6**) comme déjà décrit dans la littérature [151], [158]–[161]. Cependant, la lignée 4T1 présente un niveau protéique d'ANXA1 plus faible par rapport aux lignées MDA-MB-231-luc et SUM149 (**Figure 46C**). Ceci peut être dû à une reconnaissance plus faible de la protéine murine par l'anticorps. Cependant, une étude de De Graauw a également montré cette différences d'expression entre les lignées cellulaires 4T1 et MDA-MB-231-luc [175]. Nous avons de plus observé une présence plus importante d'ANXA1 chez les lignées humaines de mélanome possédant les capacités invasives les plus importantes : SK-MEL-28 et A375-MA2 (**Figure 46B&D, Tableau 6**). Ces données confortent de précédents résultats montrant la présence préférentielle de l'ANXA1 dans les lignées cellulaires invasives [196], [198]. De plus, Rondepierre et ses collaborateurs ont mis en lumière une surexpression de l'ANXA1 chez les cellules B16Bl6 capables de former des métastases pulmonaires *in vivo*, par rapport aux cellules B16F10 dont elles dérivent et qui ne forment pas de métastases [199]. **L'ensemble de ces résultats soutient donc le rôle de l'ANXA1 dans le phénotype agressif des cellules tumorales.**

L'ANXA1 extracellulaire a été étudiée par CMF et par western blot (**Tableau 6, Figure 47**). Ces études ont permis de montrer que la part extracellulaire de l'ANXA1 est moins abondante que l'intracellulaire. Ce résultat correspond avec la localisation préférentiellement cytosolique de l'ANXA1 [6]. Contrairement à l'analyse de l'ANXA1 totale, l'étude de sa localisation membranaire ne permet pas de discriminer les lignées TN des non TN et de stratifier les mélanomes en fonction de leurs capacités invasives (**Tableau 6**). Cependant, les lignées invasives SK-MEL-28 et MDA-MB-231-luc sont capables de sécréter plus d'ANXA1 que les autres lignées cellulaires de mélanome et de CS respectivement (**Figure 47**). Même si peu d'études se sont intéressées à l'ANXA1 tumorale extracellulaire, certaines ont montré que la lignée luminale MCF7 possède de l'ANXA1 membranaire mais n'est pas capable de sécréter la protéine [168], [169]. Par contre la lignée TN MDA-MB-231

sécrète de l'ANXA1 [169]. La différence entre les cellules TN et non TN pourrait donc s'établir plutôt sur leurs capacités sécrétoires qu'au niveau de la localisation membranaire de l'ANXA1. Plusieurs travaux réalisés au laboratoire ont également permis de mettre en évidence la capacité de différentes lignées de mélanome à sécréter de l'ANXA1. La lignée A375, dont dérive les cellules A375-MA2, présente de l'ANXA1 au niveau de sa membrane et sécrète cette dernière de façon plus importante que les lignées M3Dau et WM1552C moins invasives [196], [202].

Plusieurs études se sont intéressées au clivage de l'ANXA1 dans le cadre de l'inflammation et du cancer. En effet il a été montré que le clivage de la protéine par PR3 ou la calpaïne I est associé à des effets pro-inflammatoires [72], [73]. De plus, le blocage du clivage de l'ANXA1 dépendant de la cathepsine D dans les cellules de CSTN MDA-MB-231 limite leur agressivité *in vitro* [170]. De façon intéressante, nous avons observé chez les cellules MDA-MB-231-luc, SK-MEL-28 et A375-MA2 la présence d'ANXA1 clivée extracellulaire, principalement membranaire (**Figure 46C&D, Figure 47A&B**). En effet l'ajout de l'EGTA diminue la présence de la forme clivée dans les lysats cellulaires et l'augmente dans les surnageants de culture. Ceci suggère que le clivage de l'ANXA1 se fait principalement au niveau de la membrane de ces cellules. De plus, on peut noter que les cellules présentant la forme clivée possèdent des capacités à la fois migratoires et invasives. Plusieurs études ont déjà montré ou suggéré que le clivage de l'ANXA1 ait lieu dans le compartiment extracellulaire, particulièrement au niveau de la membrane plasmique [71], [121], [169], [202]. De plus, la forme clivée apparaît préférentiellement au niveau des lignées les plus agressives. Par exemple, à l'inverse de la lignée luminale MCF7, les cellules TN MDA-MB-231 possèdent de l'ANXA1 sous sa forme 33 kDa [169], [170]. Des résultats précédemment publiés par le laboratoire ont également montré une corrélation positive entre la présence de la forme clivée et les capacités invasives des cellules de mélanome [202]. Nos résultats confortent donc les données précédemment obtenues pour la lignée MDA-MB-231-luc et renforcent les données sur le clivage de l'ANXA1 dans lignées de mélanome SK-MEL-28 et A375-MA2.

L'importance de la part extracellulaire de l'ANXA1 (notamment sécrétée et/ou clivée) dans des processus associés à l'agressivité des cellules tumorales tels que la migration ou encore l'invasion est mise en exergue dans l'ensemble de ces données. Cependant des études statistiques de corrélation sont nécessaires afin de confirmer un réel lien entre l'ANXA1 extracellulaire et ces processus et de discriminer l'action de ses différentes formes (membranaire/sécrétée, totale/clivée) dans plusieurs lignées cellulaires. De plus, cette hypothèse ne semble pas définir une généralité puisque certaines lignées agressives ne sécrètent pas d'ANXA1 et ne présentent pas la forme clivée comme par exemple les cellules de carcinome pancréatique PANC-1 [121]. A l'inverse, les cellules épithéliales mammaires MCF-10A (non tumorales) libèrent de l'ANXA1 sous forme clivée [169].

Dans cette étude nous avons choisi une stratégie visant à bloquer l'action de l'ANXA1 extracellulaire. Pour ce faire, les cellules MDA-MB-231-luc, SK-MEL-28 et A375-MA2 ont été traitées avec un anticorps bloquant, le VJ4B6. L'utilisation de l'ANXA1 recombinante humaine et les études de CMF ont permis de montrer que le VJ4B6 reconnaît la protéine (**Figure 48, Tableau 7**). Ces données complètent celles déjà disponibles dans le brevet de l'anticorps. Les différences observées avec l'anticorps commercial (71-3400, Invitrogen) peuvent s'expliquer de différentes façons. Dans un premier temps, l'anticorps 71-3400 est polyclonal et peut donc reconnaître plusieurs épitopes au niveau de l'ANXA1 contrairement au VJ4B6 qui est monoclonal. L'affinité des deux anticorps avec l'ANXA1 peut également différer. Notre étude est aussi limitée par le fait que nous n'avons pas pu accéder à la concentration de l'anticorps commercial, les deux anticorps n'ont donc pas été utilisés à des quantités égales. Il est également plus que probable que les sites de reconnaissance des deux anticorps soient différents et que leur accessibilité ne soit donc pas la même, particulièrement dans un contexte cellulaire où la protéine peut présenter différentes conformations. Nous savons notamment que le VJ4B6 ne reconnaît que la forme intacte non clivée de la protéine contrairement à l'anticorps commercial.

Malgré notre stratégie d'augmenter la concentration du VJ4B6 (de 50 ng/mL à 20 µg/mL), ce dernier n'a pas eu d'influence sur la migration des cellules MDA-MB-231-luc et A375-MA2 (**Figure 49&50**). Ceci peut s'expliquer par deux hypothèses, **(i)** l'ANXA1 extracellulaire n'est pas impliquée dans la migration tumorale dans nos conditions d'études ou **(ii)** l'anticorps ne permet pas de bloquer la forme active de l'ANXA1. **(i)** De nombreuses études ont montré que l'ANXA1 tumorale est capable de stimuler la migration cellulaire dans différents types de cancer comme le cancer du pancréas [120]–[122], du foie [104], de l'œsophage [118], [136], de l'estomac [111], [134], du poumon [119], du sein [161], [165], [167], [169], [171], [276] ou encore le cancer nasopharyngé [114]. Ces études se sont basées sur la modification de l'expression de la protéine dans les cellules tumorales. En revanche, peu d'analyses se sont focalisées sur le rôle de l'ANXA1 extracellulaire issue des cellules tumorales. Cependant l'utilisation du peptide Ac2-26 s'est montrée efficace pour stimuler la migration des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et pancréatiques MIA PaCa-2 et PANC-1 [121], [169]. De plus, ces cellules présentent à leur surface les récepteurs FPR de type FPR1. Les récepteurs FPR sont également présents à la surface de cellules de mélanome comme SK-MEL-3 et A375 [196]. Ces données suggèrent donc un rôle extracellulaire de l'ANXA1 sur la migration. Nous avons également étudié les récepteurs FPR au niveau ARN et protéique. Cependant pour toutes les lignées cellulaires étudiées (T47d, MCF7, MCF7-luc, SUM1315, SL, SB, HCC1937, SUM149, MDA-MB-436, MDA-MB-231, MDA-MB-231-luc, 4T1, SK-MEL-3, SK-MEL-28, A375-MA2, B16Bl6), l'expression des trois types de récepteurs est très faible voire nulle, avec de façon surprenante un niveau plus élevé de FPR3. Notre étude de CMF a

également montré une très faible présence du récepteur FPR2 à la surface des cellules. Au vu des données de la littérature il serait intéressant d'effectuer également cette étude sur les récepteurs FPR1 puisque certaines lignées cellulaires n'exposent à leur surface que certains types de FPR [121], [169]. Le traitement des cellules tumorales avec le peptide Ac2-26 pourrait permettre d'étudier si la quantité de FPR présents à la surface des cellules tumorales est suffisante pour déclencher une signalisation cellulaire. **(ii)** L'étude sur les lignées de cancer pancréatique utilisant également un anticorps dirigé contre l'ANXA1 a permis de montrer que ce dernier est efficace pour limiter la migration des cellules MIA PaCa-2 capables de sécréter de l'ANXA1 mais pas les PANC-1 qui ne sécrètent pas la protéine [121]. Le ciblage de l'ANXA1 extracellulaire à l'aide d'anticorps est donc une stratégie intéressante. Au vu des données concernant le peptide précédemment évoqué, l'action de l'ANXA1 extracellulaire est possible grâce au domaine Nter de la protéine. Ce dernier peut être lié à la protéine ou libre dans le milieu extracellulaire suite au clivage de la protéine. Le VJ4B6 n'est pas capable de se lier au peptide libre et ne peut donc pas bloquer son action. Il serait donc intéressant de déterminer si l'anticorps une fois lié à l'ANXA1 sous sa forme intacte permet d'inhiber ou non son clivage. Si ce n'est pas le cas, ceci pourrait expliquer son inefficacité à ralentir la migration cellulaire. Il serait alors intéressant de combiner son utilisation à un inhibiteur du clivage de l'ANXA1. En effet, le VJ4B6 ciblerait la protéine sous sa forme intacte et l'inhibiteur permettrait de s'affranchir de la formation du peptide bioactif non ciblé par l'anticorps. L'inhibition du clivage de l'ANXA1 par la cathepsine D s'est d'ailleurs montrée récemment efficace dans le cancer du sein. En effet, la pepstatine A permet de diminuer la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231 *in vitro* [170]. Il serait également pertinent de tester en parallèle du VJ4B6 une stratégie d'étude de l'ANXA1 extracellulaire ne visant pas à bloquer son action. Belvedere et ses collaborateurs ont par exemple montré que le surnageant des cellules MIA PaCa-2 capables de sécréter de l'ANXA1 permet de stimuler la migration des cellules PANC-1. Cet effet stimulateur est aboli lorsque le surnageant contient un anticorps ciblant l'ANXA1. A l'inverse le traitement des cellules MIA PaCa-2 avec le surnageant des cellules PANC-1 qui ne libèrent pas d'ANXA1 n'a aucun effet sur leur migration [121].

En ce qui concerne notre analyse *in vivo* préliminaire, le VJ4B6 n'a eu d'effet ni sur la croissance ni sur la dissémination tumorale (**Figure 51**). Cependant, plusieurs limites peuvent être discutées quant à cette observation. Afin de travailler dans un modèle syngénique, au vu du lien étroit existant entre ANXA1 et système immunitaire, nous avons dû utiliser la lignée murine B16Bl6. Cependant, comme nous l'avons vu lors de la caractérisation (**Tableau 6, Figure 47**), cette lignée présente peu d'ANXA1 extracellulaire ce qui limite donc le ciblage par l'anticorps. Il serait donc intéressant de rechercher une lignée cellulaire murine de mélanome présentant un niveau plus élevé d'ANXA1 extracellulaire. Il serait également possible de travailler avec les cellules humaines caractérisées lors de l'étude comme les

MDA-MB-231-luc, les SK-MEL-28 ou encore les A375-MA2. Cependant, dans ces conditions, l'utilisation de souris immunodéprimées est exigée. De plus, même si l'anticorps reconnaît la protéine murine, il est décrit et breveté comme ciblant la forme humaine de la protéine. Il est donc possible que les capacités de reconnaissance *in vivo* soient également limitées par ce biais puisque que la protéine humaine et murine partage 87% d'identité protéique (88% domaine Cter et 85% domaine Nter). On peut également se poser la question de l'accessibilité de l'anticorps à la tumeur. Des études de bio-distribution de l'anticorps *in vivo* pourraient permettre de déterminer le pourcentage de VJ4B6 injecté réellement présent au sein de la tumeur. Afin d'améliorer l'accessibilité à la tumeur il aurait également pu être intéressant de réaliser les injections du VJ4B6 en intra-tumoral.

Comme pour les expérimentations *in vitro*, nous nous sommes également questionnés sur la dose de VJ4B6 utilisée. Cependant la disponibilité de l'anticorps n'a pas permis de réaliser une seconde expérience en augmentant la quantité de VJ4B6 administrée d'environ 10 µg/kg à 10 mg/kg [274]. Cette question de concentration est d'autant plus importante que la société Medannex vient récemment de rendre publique des données concernant un anticorps ciblant l'ANXA1 nommé MDX-124 [277]. Cet anticorps n'est autre que le VJ4B6 sous sa forme humanisée et possède donc les mêmes régions de complémentarité de ce dernier. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé un modèle murin de souris BALB/c porteuses de tumeurs orthotopiques mammaires 4T1-luc. Le traitement des souris avec 1 mg/kg de MDX-124 (soit cent fois plus que ce que nous avons utilisé dans notre étude) permet de diminuer de façon significative le volume tumoral.

L'ensemble de nos données montre que l'utilisation de l'anticorps bloquant VJ4B6 dans nos conditions d'études ne permet pas de moduler l'agressivité tumorale in vitro et in vivo. Cependant il est très intéressant de remarquer qu'il existe entre les souris WT et les souris KO une différence au niveau du développement tumoral. En effet, ce dernier semble ralenti chez les souris KO n'exprimant pas l'*Anxa1*. L'ANXA1 issu des cellules stromales pourrait donc jouer un rôle important dans le développement tumoral.

5- Conclusions et perspectives

Cette étude a permis d'obtenir sur quatre lignées de cancer du sein et quatre lignées de mélanomes des informations concernant à la fois l'expression et la localisation de l'ANXA1. Certaines des lignées présentant des phénotypes agressifs connus sont capables de sécréter l'ANXA1 et possèdent également la forme clivée de cette dernière. Il serait intéressant pour de futures études

d'analyser plus précisément le rôle du clivage de l'ANXA1 en recherchant par exemple d'éventuelles corrélations entre ce dernier et les processus tels que la migration, l'invasion ou encore TEM par exemple. Le ciblage de l'ANXA1 extracellulaire avec le VJ4B6 ne s'est pas montré efficace pour limiter la migration *in vitro* et le développement tumoral *in vivo*. Cependant, ces résultats sont peut-être dus à la faible dose de traitement utilisée, des expériences complémentaires sont donc requises pour valider le rôle pro-métastatique de l'ANXA1 extracellulaire. Il est tout à fait possible que l'ANXA1 libérée par les cellules tumorales ne soit pas responsable d'une autorégulation positive de ces dernières étant donné la très faible détection des récepteurs FPR dans les lignées cellulaires étudiées. L'action de cette ANXA1 pourrait être plutôt dirigée vers les cellules du microenvironnement comme les cellules immunitaires qui peuvent exprimer de façon notable ces FPR et ainsi réguler indirectement les cellules tumorales.

Le ciblage de l'ANXA1 extracellulaire reste donc une piste intéressante pour limiter l'agressivité tumorale. De plus, les stratégies de ciblage utilisant des anticorps sont doublement pertinentes puisque ces derniers peuvent également être utilisés pour la radiothérapie dite vectorisée qui vise à diriger une source radioactive spécifiquement au niveau des cellules tumorales. Dans le cadre de l'ANXA1 qui est dans de nombreux cancers surexprimée dans les cellules tumorales, cette stratégie thérapeutique pourrait être étudiée. Une étude de 2004 a d'ailleurs montré que le traitement de rats porteurs de colonies pulmonaires (issues de cellules d'adénocarcinome mammaire 13762) avec un anticorps anti-ANXA1 marqué à l'iode 125 permet de considérablement améliorer leur survie par rapport aux rats témoins [259].

L'étude *in vivo* a également permis de mettre en lumière l'implication probable de l'ANXA1 stromale dans le développement tumoral. Cette piste est intéressante à poursuivre puisque des données de la littérature supposent un lien entre ANXA1 et microenvironnement tumoral (cf partie 3, paragraphe 2).

PARTIE 2 : ÉTUDE DU RÔLE DE L'ANNEXINE A1 TUMORALE ET STROMALE DANS LA PROGRESSION DU MÉLANOME

1- Présentation de l'article

1.1- Contexte et objectif

L'ANXA1 a très largement été décrite pour son rôle dans l'inflammation (immunité innée), notamment en tant que médiateur des GC. En effet, elle est exprimée par de nombreuses cellules immunitaires et est capable de réguler leurs fonctions. Elle limite par exemple la migration trans-endothéliale des neutrophiles [69] et stimule leur apoptose [75]. De plus, son expression au niveau des macrophages permet de stimuler leur phagocytose [55], [84]. Ces propriétés anti-inflammatoires sont associées à la localisation extracellulaire de la protéine et notamment à sa liaison avec les récepteurs FPR2 [57]. Les GC sont capables de stimuler à la fois l'expression et la translocation membranaire de l'ANXA1 [56]. Cette dernière peut également moduler l'immunité adaptative en stimulant la prolifération et l'activation des lymphocytes T [97], [98].

L'ANXA1 présente également un grand intérêt en cancérologie du fait de sa dérégulation dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains et de son implication dans la progression tumorale. En effet, l'ANXA1 de certaines cellules tumorales est par exemple capable de stimuler la formation de métastases *in vivo* [111], [114], [120], [175]. En ce qui concerne le mélanome, des études précédemment publiées par notre équipe sur la lignée murine B16Bl6 ont permis de montrer l'importance de l'ANXA1 tumorale dans l'invasion *in vitro* [199] et *in vivo* [196]. Le rôle du microenvironnement sur le développement et la dissémination tumorale est aujourd'hui incontesté (cf partie 3, paragraphe 1). Plusieurs travaux soulignent le rôle de l'ANXA1 au niveau de différents types cellulaires de ce microenvironnement. Elle est par exemple capable de favoriser certaines cellules immunitaires pro-tumorales comme les macrophages de type M2 (TAM) [247] et les lymphocytes Treg [250]. Elle est également préférentiellement présente au niveau des endothéliums

tumoraux par rapport aux sains [259], [260]. De façon intéressante, des études utilisant des souris n'exprimant pas l'*Anxa1* ont permis de montrer l'implication de l'ANXA1 des cellules stromales dans la progression du cancer du sein [174], [247], [248], du poumon et du mélanome [246]. Cependant, l'analyse concernant le mélanome s'est basée sur l'utilisation de cellules B16 qui n'expriment pas l'ANXA1 et sont incapables de former des métastases.

L'objectif de cette étude a donc été de mieux comprendre le rôle spécifique de l'ANXA1 issue des cellules tumorales et des cellules du microenvironnement dans la progression du mélanome.

1.2- Principaux résultats

NB : Les renvois aux figures et tableaux font ici référence aux numéros de l'article présenté dans le paragraphe 2.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé par différentes techniques l'expression ainsi que la localisation de l'ANXA1 dans différentes lignées cellulaires humaines de mélanome (**Figure 1, Tableau 2**). Nous avons pour cela choisi la lignée SK-MEL-3 pour laquelle le niveau protéique d'ANXA1 avait été décrit précédemment par notre équipe [196], [202]. Nous avons également étudié deux nouvelles lignées humaines : SK-MEL-28 et A375-MA2. Cette étude a été plus largement présentée dans le paragraphe 3.1 de la partie 1. Cette étude de caractérisation nous a permis de sélectionner les lignées SK-MEL-28 et A375-MA2 pour les analyses de migration puisqu'elles expriment l'ANXA1 sous ses différentes formes (cytosolique, membranaire, sécrétée, clivée).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rôle de l'ANXA1 tumorale dans la prolifération et la migration cellulaire (**Figure 2**). Pour cela, les cellules ont été transfectées avec un ARN interférent dirigé contre l'ANXA1 (siANXA1) permettant de diminuer le niveau protéique de cette dernière. Nous avons ainsi montré que la diminution du niveau de l'ANXA1 limite la prolifération cellulaire des lignées SK-MEL-28 et A375-MA2. En revanche, elle permet seulement de diminuer les capacités migratoires de la lignée SK-MEL-28. Nous avons également évalué l'influence d'un apport exogène de l'ANXA1 sur la migration cellulaire en utilisant un peptide représentant une partie active du domaine Nter de la protéine (Ac2-26). Contrairement à la transfection avec le siANXA1, le peptide n'influence pas la prolifération cellulaire mais stimule la migration des cellules A375-MA2 sans modifier celle des SK-MEL-28.

Nous nous sommes par la suite focalisés sur l'analyse de l'ANXA1 stromale en utilisant un modèle de souris C57Bl6/J invalidées (KO) pour l'*Anxa1* (**Figure 3**). Ces animaux, ainsi que les souris sauvages (WT) correspondantes, ont été injectés en sous-cutané avec des cellules murines de mélanome B16Bl6 qui expriment l'ANXA1. Nous avons choisi ce modèle syngénique afin d'inclure dans l'étude la composante immunitaire. Nous avons ainsi pu démontrer que les tumeurs développées chez les souris KO ont une croissance ralentie et développent moins de métastases pulmonaires que chez les souris WT (**Figure 3**). Des analyses histologiques ont également révélé une prolifération ainsi qu'une vascularisation plus faible au niveau des tumeurs des souris KO par rapport à celles des souris WT (**Figure 4**). L'étude de différents marqueurs de cellules immunitaires réalisée par RT-qPCR a mis en évidence un afflux lymphocytaire plus abondant chez les tumeurs développées en absence d'ANXA1 environnante. Cependant, on observe à la fois une augmentation des cellules immunitaires cytotoxiques (LT CD8+ et NK) et pro-tumorales (LTreg) (**Figure 5**).

1.3- Discussion

L'ANXA1 présente un grand intérêt en tant que biomarqueur en oncologie. Cependant, son rôle exact au sein des mécanismes menant au développement et à la dissémination tumorale reste peu clair, voir controversé. Cette étude a donc visé à mieux comprendre le rôle de l'ANXA1 tumorale et non tumorale dans la progression du mélanome. Nos données révèlent que la transfection des cellules SK-MEL-28 et A375-MA2 avec le siANXA1 diminue leur prolifération, mais les effets sur la migration sont dépendants du type cellulaire. En effet le siANXA1 limite la migration des cellules SK-MEL-28 tandis que le peptide Ac2-26 stimule celle des cellules A375-MA2. Cette différence peut s'expliquer, entre autres, par des capacités migratoires plus élevées au niveau des cellules SK-MEL-28. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle stimulateur de l'ANXA1 sur la migration cellulaire dans différentes pathologies cancéreuses comme par exemple le cancer du foie [104] ou encore le cancer du sein [161], [169]. En ce qui concerne la prolifération, des résultats plus hétérogènes ont été obtenus. Par exemple, l'ANXA1 stimule la prolifération des cellules cancéreuses de poumon [119] et de l'œsophage [118] mais elle est associée à des effets antiprolifératifs dans le cancer de l'estomac [134] et du sein [166], [167]. Dans le cas du mélanome, notre étude démontre le rôle stimulateur de l'ANXA1 sur la prolifération.

L'analyse de l'ANXA1 stromale a été plus informative. En effet, nos données ont montré pour la première fois dans le mélanome que l'absence d'ANXA1 chez l'hôte limite à la fois le développement

et la dissémination tumorale. Ceci peut en partie s'expliquer par une prolifération et une vascularisation moins importante ainsi qu'un afflux lymphocytaire augmenté au niveau des tumeurs des souris KO, limitant ainsi le développement tumoral et la formation des métastases. En 2009, Yi et ses collaborateurs ont également montré que les tumeurs de mélanome développées chez des souris KO pour l'*Anxa1* sont plus petites et moins vascularisées que celles des souris WT [246]. Cependant leur modèle d'étude ne leur avait pas permis d'étudier la formation des métastases. De plus, les vaisseaux tumoraux étant plus perméables que les vaisseaux normaux, il est probable que l'afflux de lymphocytes (à la fois pro- et anti-tumoraux) au niveau des tumeurs des souris KO, soit du à une perméabilité exacerbée en absence d'ANXA1 au niveau des cellules endothéliales. Cette hypothèse est soutenue par une étude montrant que l'ANXA1 est capable de réguler la perméabilité paracellulaire des cellules endothéliales du cerveau en modulant des protéines jonctionnelles comme l'occludine et la VE-Cadhérine [278]. Comme pour l'ANXA1 tumorale, l'implication de l'ANXA1 stromale dans la dissémination tumorale a été montrée dans d'autres types de cancers grâce à l'utilisation de souris invalidées. C'est par exemple le cas du cancer du poumon [246] et du sein [174], [247]. De façon générale, ces données ainsi que nos résultats s'accordent à démontrer que l'ANXA1 des cellules stromales est capable de moduler à la fois le développement et la dissémination tumorale.

1.4- Conclusion

L'importance de l'ANXA1 stromale dans le développement tumoral et la formation des métastases dans le mélanome, probablement via la modulation de l'angiogenèse, ressort clairement de ces travaux. Nos données soutiennent donc l'intérêt de l'étude du rôle de l'ANXA1 dans différents modèles de mélanome ainsi que son ciblage potentiel dans le cadre d'approches thérapeutiques.

NB : *Sans l'épidémie de la COVID-19, cette étude aurait dû être complétée par une analyse in vivo supplémentaire. Cette dernière devait nous permettre d'étudier le rôle de l'ANXA1 tumorale dans la progression du mélanome en utilisant le même modèle d'étude que pour l'ANXA1 stromale, soit l'injection sous-cutanée de cellules B16Bl6 à des souris C57Bl6/J WT et KO. Nous avons en effet pour projet d'injecter des cellules sauvages et des cellules invalidées pour l'*Anxa1* (KO) grâce à la technique CRISPR/Cas9. Nous avons sous-traité la génération des cellules KO à une société portugaise qui a cessé son activité de service afin de s'impliquer dans la crise sanitaire. Les projets ont donc pris énormément de retard ne permettant pas d'inclure cette expérience dans la thèse ni dans l'article.*

2- Article prochainement soumis

New insights in ANXA1 role in melanoma progression: involvement of stromal expression in dissemination.

Solène Delorme¹, Maud Privat^{1,2}, Nicolas Sonnier^{1,2}, Jacques Rouanet¹, Tiffany Witkowski¹, Myriam Kossai^{1,3}, Nina Radosevic-Robin^{1,3}, Gaëtan Juban⁴, Ioana Molnar^{1,5}, Mercedes Quintana¹, Françoise Degoul¹

¹ Université Clermont Auvergne, INSERM, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, UMR1240, 58 Rue Montalembert, 63005, Clermont-Ferrand Cedex, France.

² Département d'Oncogénétique, Centre Jean Perrin, 63000, Clermont-Ferrand, France.

³ Département de Pathologie, Centre Jean Perrin, 63000, Clermont-Ferrand, France.

⁴ Institut NeuroMyoGène, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, Université Lyon, Lyon 69008, France.

⁵ Département de recherche Clinique et innovation, Centre Jean Perrin, 63000, Clermont-Ferrand, France.

Email addresses:

solene.delorme@inserm.fr

nina.robin@clermont.unicancer.fr

maud.privat@clermont.unicancer.fr

gaetan.juban@univ-lyon1.fr

nicolas.sonnier@clermont.unicancer.fr

ioana.molnar@clermont.unicancer.fr

jacques.rouanet@inserm.fr

mercedes.quintana@uca.fr

tiffany.witkowski@inserm.fr

francoise.degoul@inserm.fr

myriam.kossai@clermont.unicancer.fr

Running title: Role of ANXA1 in melanoma progression

Abstract

ANXA1, first described in inflammation, appears deregulated in many cancers and increased in melanomas compared to melanocytes. To date, few studies have investigated the role of ANXA1 in melanoma progression. Furthermore, various cell types including immune and endothelial cells express this protein. We thus analyzed specific roles of ANXA1 from melanoma and stromal cells in two human cell lines (A375-MA2 and SK-MEL-28) *in vitro* and in *Anxa1* null C57Bl6/J mice bearing B16Bl6 tumors, respectively. We reported a decrease of proliferation in both ANXA1 siRNA A375-MA2 and SK-MEL-28, but cell-dependent effects of ANXA1 in *in vitro* migration. However, we observed a significant decrease of B16Bl6 tumor growth associated with a reduction of Ki-67 positive cells in *Anxa1* null mice compared to wild-type mice. Interestingly, we also showed a significant reduction of spontaneous metastases that can be attributed to decreased angiogenesis concomitantly to higher immune cell presence in the *Anxa1* null stromal context. This study highlighted a pejorative role of ANXA1 from both tumor and stromal cells in melanoma, due to its involvement in proliferation and angiogenesis.

Keywords: ANXA1, melanoma, migration, proliferation, metastases, angiogenesis, immune infiltrate

Introduction

Annexin A1 (ANXA1) is historically a protein involved in inflammation, decreasing neutrophil diapedesis to inflamed sites and inducing their apoptosis there [1]. This is mediated by extracellular forms of ANXA1 whose expression can be modified by glucocorticoids (GC). Macrophages can also produce ANXA1 upon stimulation by GC, secreted ANXA1 in paracrine or autocrine fashions, facilitating engulfment of apoptotic cells [1]. The ANXA1 receptor described at the moment is formyl peptide receptor 2: FPR2 (also known as ALXR) belonging to the FPR family whose canonic ligands are bacterial formylated peptides. Recently, ANXA1 was shown to trigger reparative macrophage function via FPR2 activating AMPK pathway in a model of muscle injury [2]. Besides this role in innate immunity, ANXA1 can boost the adaptive immunity as demonstrated by Dr F D'Acquisto [3]. Interestingly, in knockout (KO) mice infected with mycobacterium tuberculosis, lack of ANXA1 decreased CD8⁺ activation by DC [4]. Similarly ANXA1 is an actor of immunogenic cell death following specific cancer chemotherapies or radiotherapies [5-8].

During the last twenty years ANXA1 has been highlighted as a biomarker for different cancers (for a review see [9]). As a potential consequence of its immunomodulatory and additional roles, ANXA1 expression is either reduced or increased in tumors according to cancer types. For some localization, as in breast cancers, conflicting results have been reported [10]. Our team observed an increased expression of ANXA1 in invasive melanomas in preclinical models that was confirmed on a patient cohort [11, 12]. Our hypothesis was that external ANXA1, linked to the plasma membrane or secreted, can activate invasive pathways in melanoma cells via FPR. This was also proposed for other malignancies such as breast, gastric or prostate cancers, or gliomas (for a review see [13]). Our team and others showed that manipulating ANXA1 level in tumors can affect their metastatic behavior. More specifically, decreasing tumor ANXA1 induces lower metastases in 4T1 murine breast cells implanted in NOD2SCID mice [14], in syngeneic murine melanoma B16Bl6 [12] and in Mia-Paca2 pancreatic tumors in SCID mice [15]. Interestingly, decreasing stromal ANXA1 is associated with a slow-down of tumor growth in B16, and also with reduced metastases in LLC and 4T1 tumors in syngeneic models [16, 17]. These later observations were linked to decreased angiogenesis assuming the presence of ANXA1 as a pivotal clue for vasculature wall in tumors [18] and to its immunomodulatory role leading to a M1 phenotype for tumor associated macrophages (TAMs) [16].

Altogether, these data encouraged us to further analyse involvement of tumoral and stromal ANXA1 in melanoma progression. To improve our knowledge on ANXA1 in human melanomas, we selected two aggressive cell lines A372-MA2 and SK-MEL-28 to assess the role of ANXA1 on their migrating properties using exogenous Ac2-26 peptide mimicking ANXA1 amino-terminus (Nter) part or siRNA

specific ANXA1 knockdown. Furthermore, considering melanoma, the role of stromal ANXA1 merits further attention as the reported results were obtained on a B16 cell line without ANXA1 expression and not able to metastasize [17]. Hence, we investigated the effect of stromal ANXA1 on the tumor growth and metastases occurrence in B16Bl6-/C57Bl6/J model using *Anxa1* KO mice. Our results suggested that tumoral ANXA1 is involved in human melanoma proliferation and depending on cell lines in migration *in vitro*. In addition, they supported an important role of stromal ANXA1 in both melanoma development and dissemination *in vivo*, probably through its involvement in tumor proliferation and angiogenesis.

Materials and methods

Cell cultures and reagent

Human melanomas SK-MEL-3 (derived from lymph node metastasis of a female patient), SK-MEL-28 (derived from lymph node metastasis of a male patient) and A375-MA2 (derived from a non-metastatic cutaneous melanoma, further selected to become metastatic) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). The murine B16Bl6 cell line was from Professor Fidler's lab (Texas University, Houston, USA). B16Bl6-luc cells expressing luciferase gene were engineered in our laboratory by Dr Claire Viallard. A375-MA2 and B16Bl6 were cultured in DMEM-Glutamax (31966-021, Invitrogen) with 10% of fetal calf serum (FCS, CVFSVF00-01, Eurobio), SK-MEL-3 in McCOY'S 5A (26600-023, Invitrogen) with 15% of FCS and SK-MEL-28 in MEM-Glutamax (41090028, Invitrogen) with 10% of FCS. All the media were supplemented with 4 µg/mL of gentamycine (15750-037, Invitrogen). Cells were grown at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% CO₂. Cells were treated with the peptide Ac2-26 that mimics the Nter domain of ANXA1 at 10 µM (1845, Tocris).

ANXA1 expression analysis by RT-qPCR using TaqMan method

Total RNA was extracted from cultured cells (SK-MEL-3, SK-MEL-28, A375-MA2) according to the manufacturer's instructions using RNeasy mini kit (Qiagen). Samples were then quantified and RNA integrity was checked by Agilent 2100 Bioanalyzer using Agilent RNA 6000 nano kit (Agilent Technologies). RNA were reverse-transcribed from 1 µg RNA with a high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the protocol supplied by the manufacturer. Reverse Transcription was performed as followed: 10 min at 25 °C, 120 min at 37 °C and 5 min at 85

°C. Real-time PCR using TaqMan method was realized on 25 ng of cDNA. *UBC* gene was used as an endogenous control. The following primers and TaqMan probes with FAM-MGB (VIC-MGB for *UBC*) dye-labeled were used in the reaction: Hs00167549_m1 for *ANXA1* and Hs01871556_s1 for *UBC*. The cycling parameters consisted of a first step at 50 °C for 2 min and at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 sec and 60 °C for 1 min. Three experimental replicates were performed. Cycle thresholds were analyzed with SDS2.4 and RQ Manager 1.2 software. Relative quantification was carried out using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Cell lysate and supernatant analysis of ANXA1 level by Western Blot

Cells were seeded at 2×10^5 cells per well in 6 well plates for 24 h. After three washes with DPBS, supernatants were removed and replaced by 1 mL of OptiMEM (31985-047, Invitrogen) containing 0.9 mM CaCl_2 (C4901, Sigma-Aldrich) and supplemented or not with a calcium chelator EGTA (E-4378, Sigma-Aldrich). The supernatant was collected and centrifuged at 460 xg for 8 min at room temperature. Final supernatants were concentrated at 4 °C using 10 kDa cut-off concentrators (Vivaspin 500, VS0102, Sartorius Stedim) to reach a volume less than 30 μL . Each supernatant sample was used in its entirety for Western Blot analyses. Cells were lysed by RIPA buffer containing 50 mM Trizma Base (T1503, Sigma-Aldrich) pH7.5, 150 mM NaCl (7647-14-5, Merk), 1% NP40 (74385, Fluka), 0.5% sodium deoxycholate (D6750, Sigma-Aldrich), 0.1% SDS (19812323, Biosolve) and supplemented with 1X phosphatase and protease inhibitors (78443, ThermoFisher Scientific). After one centrifugation at 10 000 xg for 10 min at 4 °C, protein concentration was estimated according to the Bradford's protein assay (23200, Invitrogen). Equal amounts of protein from each sample (40 μg) were used for Western Blotting.

Proteins were separated through 4-15% SDS-PAGE (456-8084, Bio-Rad) and transferred onto nitrocellulose membranes (1620115, Bio-Rad). Membranes were blocked in TBS (pH7.6, 200 mM Trizma Base and 1.5 M NaCl) containing Tween20 (0.1%) (9005-64-5, FisherScientific) and 5% milk for 1 h and incubated one night at 4 °C with anti-ANXA1 (rabbit polyclonal, 1:10000, 71-3400, Invitrogen). After three washes in TBS-Tween20, membranes were incubated 1h30 with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000, 4050-05, SouthernBiotech). After three washes, detection of HRP activity was performed with Clarity™ Western ECL Substrat (170-5061, Biorad) and a ChemiDoc™ MP Imaging System (Biorad). Total protein normalization was applied using the stain-free technology. Semi-quantitative measurement of protein level was realized using Image Lab software (Bio-rad).

ANXA1 level analysis by flow cytometry

SK-MEL-3, SK-MEL-28 and A375-MA2 cells were harvested at a number of 1×10^6 and stained with anti-ANXA1 (rabbit polyclonal, 1:500 for permeabilized and 1:100 for not permeabilized cells, 71-3400, Invitrogen) for total and membrane expression evaluation. Isotype rabbit (EB-003-0110, Diagenode) antibody was used as control. Briefly, cells were centrifuged at 400 xg for 5 min. To assess total expression, cells were permeabilized by BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 10X (347692, BD-Bioscience) for 10 min at room temperature and then centrifuged at 800 xg for 5 min. For membrane ANXA1, cells were not permeabilized. Pellets were incubated at 4 °C for 30 min in medium containing 1% BSA, 5 mM CaCl₂ (dilution buffer) and primary antibody against ANXA1. After that, cells were washed in medium containing 1% FCS, 5 mM CaCl₂ (wash buffer) and incubated at 4 °C for 30 min in dilution buffer containing AlexaFluor™ 488 anti-rabbit (1/2000, A11008, Invitrogen). After one washing, cells were stained with 4 µg/mL propidium iodide (PI) and analyzed on a BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences, CICS_UCA PARTNER). FACSDiva data manager v8 software was used to determine the percentage of labelled cells and the mean fluorescence intensity (MFI).

Cell transfection with siRNA directed against ANXA1

A375-MA2 and SK-MEL-28 cells were seeded at 2×10^5 and 1.5×10^5 cells per well respectively in 6 well plates for 24 h. Cells were transfected with 25 pmol of siRNA using the Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (13778-030, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The siRNA oligonucleotides for ANXA1 (ON-TARGETplus Human ANXA1, L-011161-00-0005) and the control (ON-TARGETplus Non-targeting siRNAs, D-001810-0X) were purchased from Horizon™. Cells were harvested 48 h post-transfection to control ANXA1 depletion by western blotting.

Migration assay

Culture inserts chamber migration assays were performed in µDish 35 mm (81176, Ibidi®). A375-MA2 and SK-MEL-28 cells were seeded at a density of 50 000 or 30 000 cell/70 µL respectively to each chamber of the culture insert. Transfected cells were seeded 24 h post-transfection. Cells were incubated for 24 h to form confluent monolayers. After that, the insert was removed leaving a cell-free gap of 500 µm without scratching the cell monolayer (48h post-transfection). Cells were rinsed three times with DPBS and fresh medium containing or not treatment was added to the dish. For siRNA experiments, 1% FCS medium was used to avoid cell proliferation. Images were taken at different times using an inverted microscope at 5x magnification (T0h corresponds to the time of insert removal and

treatments). Experiments were run at least in triplicate for each condition. Gap area was estimated using Fiji software at different times and the percentage of wound closure was calculated with the following formula: $[(T0h - T_xh) / T0h] \times 100$.

Cell viability assay

To assess the peptide Ac2-26 and the siANXA1 transfection cytotoxicity, the resazurin reduction assay was used as indicator of cell viability. Cytotoxicity was investigated 24 h and 48 h after treatment with the peptide and 48 h and 72 h post-transfection for the siANXA1. Control or transfected A375-MA2 (6×10^3 cells/well) and SK-MEL-28 (4×10^3 cells/well) cells were seeded in a 96-well plate in culture medium. Cells were allowed to adhere for about 24 h and then untransfected cells were treated with 10 μ M of Ac2-26. Cells were then washed twice with DPBS and 25 μ g/mL of resazurin was added to each well. After a 1-2 h incubation, fluorescence was measured by a microplate reader (Fluoroskan Ascent, Labsystems) using a pair of 530 nm and 590 nm as excitation and emission wavelengths respectively. Percentage of living cells was determined relative to control conditions.

In vivo experimental models

All experiments were made in accordance with the relevant guidelines and regulations and were approved by both the local Ethic committee of Clermont-Ferrand (C2E2A) and French Ministry of Education and Research (approval n°17844). C57BL6/J wild type (WT) mice were purchased from Charles River and C57BL6/J *Anxa1* KO mice were from Dr Juban from Claude Bernard University, Lyon (UMR CNRS 5310, INSERM U1217) and correspond to the ANXA1^{-/-} mice developed by Peretti 's group [19]. Groups of mixed-sex animal were used and age- and weight-matched animal were chosen.

Subcutaneous model: B16Bl6 murine melanoma cells suspended in DPBS were injected subcutaneously into mice right flank at the number of 2×10^5 . Intratumoral injections of 20 μ L of NaCl were realized at days 9 and 12 after cell implantation to promote metastases formation. The body weight of mice and the tumor sizes were measured three times per week. Tumors were measured using caliper and their volumes calculated with the formula: $(L \times S^2)/2$, where L and S are the largest and the smallest diameters in mm, respectively. Tumor growth was reported as the ratio $(V_t - V_i)/V_i$, where V_t was measured tumor volume at a given day and V_i the initial volume (first day of measure). Mice were sacrificed 19 days after cell inoculation. Tumors were removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for protein and RNA extraction or fixed in formaline (HT501128, Sigma-Aldrich)

for 24 h and stored in 70% ethanol for immunostaining analyses. Lung surfaces metastases visible under a binocular magnifier were counted.

Intravenous model: B16Bl6-luc cells suspended in DPBS were injected intravenously into mice caudal vein at the number of 1.5×10^5 . The body weight of mice was measured three times per week. Lung tumor invasion was monitored using *in vivo* bioluminescence imaging the day of cell injection (day 0) and at day 7, 14 and 18. Briefly mice were injected intraperitoneally with 15 mg/mL of luciferine (122799, PerkinElmer) and imaged 5 min after. Lung average radiance (p/s/cm²/sr) was computed using Living Image software and radiance relative to day 0 was reported as the ratio $(R_t - R_i)/R_i$, where R_t was radiance at a given day and R_i the initial radiance (day 0). Mice were sacrificed at day 18 after cell injection.

Tumor immune infiltrate analysis by RT-qPCR using SYBR green method

Tumors were dissociated for RNA extraction with a GentleMacs using program RNA_02 recommended for frozen tissues (130-093-235, Miltenyi Biotec). Total RNA was extracted according to the manufacturer's instruction using NucleoSpin® RNA (740955.250, Macherey-Nagel™). Total RNA was quantified at 260 nm using a µDrop™ Plate (N12391, ThermoScientific) as well as the RNA purity measured using the ratio of the absorbance at 260 and 280 nm. RNA (1.5 µg) were reverse-transcribed with SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix with ezDNase™ Enzyme (ThermoFisher, Courtabœuf, France). Reverse Transcription was performed as followed: 10 min at 25 °C, 10 min at 50 °C and 5 min at 85 °C. qPCR-reactions were realized in triplicate with SYBR® Mix (KAPABIOSYSTEMS, Boston, USA) on a StepOnePlus device (Applied BioSystems, Foster City, USA) (**Table 1**). The cycling parameters consisted of a first step at 95 °C for 3 min followed by 40 cycles at 95 °C for 3 sec and annealing temperature for 30 sec. PCR product specificity was checked with the melting curve. PCR cycles consisted of a step at 95 °C for 15 sec followed by dedicated annealing temperature for 1 min and a last step at 95 °C for 15 sec. Cycle thresholds were analyzed with StepOne software. Relative quantification was determined with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method after normalizing the expression to that of *Tbp*.

VEGF dosage by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Tumor proteins extraction was performed with TissueLyser system (Qiagen®) in urea buffer containing 6 M Urea (211823, Biosolve), 2.5 mM sodium pyruvate (11360-039, Invitrogen), 1 mM EDTA (15575-038, Invitrogen), 0.5% Triton X100 (T8787, Sigma) and 1X phosphatase and protease inhibitors (78443, ThermoFisher Scientific). Tumors were mechanically disrupted for 5 min at 30 Hz in 300 µL of urea

buffer using 5 mm beads. Extracts were cleared by centrifugation (10min, 14 000xg, 4°C) and run through a Bradford assay for protein quantification. ELISA analyses were run on around 20-30 µg of each extract using Quantikine® ELISA kit (MMV00, R&DSYSTEMS®) according to the manufacturer's instructions.

Histological analysis

Tumors were embedded in paraffin and cut into 4 µm serial sections. They were immunostained using specific antibodies including anti-CD31 (ab28364, Abcam) and anti-Ki-67 (ab15580, Abcam) as follow. Sections were deparaffinized and rehydrated before being subjected to antigen retrieval using 10 mM Tris, 1 mM EDTA buffer pH9 for CD31 or 10 mM citrate pH6 for Ki-67. After two washes with water and one with PBS, endogenous peroxidases were inhibited using 0.3% of hydrogen peroxide for 30 min (only for Ki-67 staining). After another PBS wash step, sections were blocked 1 h with 1% bovine serum albumin, before overnight incubation with anti-CD31 (1:100) or anti-Ki-67 (1:2000) at 4 °C. Sections were then washed with PBS, followed by 1 h incubation with a secondary anti-rabbit antibody directly coupled with AlexaFluor 555 (1:1000, A21430, Invitrogen) or with biotinylated antibody (1:500, 111-065-003, Jackson ImmunoResearch). Two PBS washes were done before incubation with peroxidase-conjugated streptavidin (1:500, 016-030-084, Jackson ImmunoResearch) for 30 min. After a washing in PBS, sections were incubated with Alexa Fluor™ 488 tyramide reagent (1:200, B40953, ThermoFisher Scientific) for 10 min and then washed twice in PBS. Nuclei were stained 5 min in Hoechst 33342 solution (1:10000, H3570, Invitrogen) and coverslips were mounted in glycerol (50% v/v PBS). Zeiss Axio Imager M2 was used to create a 4x4 mosaic image (16 tiles) with x20 objective allowing to analyze a wide field of each section. Fiji software was used to appreciate the number of vessels per tumor slide, using quantitative analysis of CD31 on mosaic images. The quantification of Ki-67 labelled cells required a pathologist expertise.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out on data from at least three independent experiments using GraphPad Prism v8.0 software. Data are presented as mean ± standard deviation. Differences with a p value <0.05 was considered to be statistically significant.

To compare two different conditions (Ctrl vs peptide; siCTRL vs siANXA1; WT mice vs KO mice), Student's t-test (with Welch's correction) was performed. When normality was not assumed,

nonparametric Mann-Whitney test was used. The significance was expressed relative to the corresponding control condition.

To evaluate relation between absence of stromal ANXA1 and the number of measurable tumors or mice with lung metastases, a contingency table was created and Chi-Square test was carried out to determined statistical significance.

Cell siANXA1 transfection effect on PCNA protein level was assessed by the protein level ratio of siANXA1/siCTRL cells. One sample Student's t-test was realized with 1 (siCTRL/siCTRL) as hypothetical value to assessed the significance of the ratio.

Results

Characterization of ANXA1 expression and localization in melanoma cell lines

Two yet non-explored human invasive cell lines A375-MA2 and SK-MEL-28 cells present higher ANXA1 mRNA than SK-MEL-3 previously studied [12] (**Figure 1A**). Cellular and membrane/secreted ANXA1 level was assessed by western blot and the EGTA use allowed to harvest calcium-dependent membrane bound fraction. In the same manner, cellular ANXA1 was high in SK-MEL-28 and A375-MA2 compared to SK-MEL-3 (**Figure 1B**). However, flow cytometry analyses (**Figure 1C**) showed similar levels of total ANXA1 as determined by mean fluorescence intensity (MFI) for SK-MEL-3 and SK-MEL-28. Interestingly ANXA1 level was twice higher in A375-MA2 relative to the other cell lines. In SK-MEL-28 and A375-MA2 cell lysates and supernatants, native (37 kDa) and cleaved form of ANXA1 were detected (33 kDa) (**Figure 1B**). To confirm the presence of membrane ANXA1 we used flow cytometry analyses with non-permeabilized cells (**Figure 1C**). A375-MA2 and SK-MEL-3 had the highest percentage of cells presenting membrane ANXA1. A375-MA2 and SK-MEL-28 expressed ANXA1 and presented extracellular forms of the protein: membrane bound and secreted. Taken together, these data identified them as relevant cell lines to investigate involvement of tumor ANXA1 in cell aggressiveness.

ANXA1 modulates melanoma proliferation and in a cell line dependent manner migration in vitro

We determined the effect of endogenous ANXA1 in proliferation and migration of SK-MEL-28 and A375-MA2 cells with specific siRNAs. After 48 h of transfection, siRNA directed against ANXA1 (siANXA1) decreased ANXA1 protein level by 59% for A375-MA2 and 53% for SK-MEL-28 compared to

control siRNA (siCTRL, data not shown but available on request). Both cell lines transfected with siANXA1 presented a reduction of cell viability compared to cells transfected with siCTRL. This reduction started 48 h post-transfection in A375-MA2 and 72 h for SK-MEL-28 (**Figure 2A and 2E**). This decrease is linked to a decline in cell proliferation (**Figure 2B and 2F**) with a significant reduction of PCNA in A375-MA2 (48 h post-transfection) and almost significant in SK-MEL-28 (72 h post-transfection, $p=0.0559$). To overcome this proliferation decrease following siANXA1 transfection, we performed migration assay in medium limited in serum (1%) for 24 h. In siANXA1 conditions, we observed a significant reduction of migration only in SK-MEL-28 from 16h (**Figure 2C and 2G**). Contrary to siANXA1, Ac2-26 peptide, which is widely used for its capacity to mimic the ANXA1 Nter domain, did not affect cell viability (not shown and available upon request). Therefore, we used complete medium for migration assays and prolonged study time for A375-MA2 cells which migrate slower than SK-MEL-28 cells. In these conditions, the peptide stimulated only A375-MA2 migration (**Figure 2D and 2H**). Taken together, our findings indicate that manipulating ANXA1 cellular and external levels lead to contradictory effects on migration according to melanoma cell lines. However, from siRNA, we may conclude that ANXA1 is positively involved in melanoma proliferation.

Stromal ANXA1 is involved in melanoma growth and metastatic capacity

To document the role of stromal ANXA1 in melanoma dissemination, we used B16Bl6 bearing C57Bl6/J mice WT and KO for *Anxa1*. As shown in **Figure 3A**, tumor apparition was delayed in KO mice with only 20% of tumor measurable with the caliper nine days after cell injection compared to 80% in WT mice. Tumor volumes were significantly reduced and growth was slowed down in KO mice compared to their WT counterparts (**Figure 3B and 3D**). This is consistent with tumor weight values at the time of sacrifice (**Figure 3C**). We next explored lung metastases in both types of mice. As shown in **Figure 3E and 3F**, KO mice were less prone to develop lung metastases and in a lesser extent compared to WT mice. To further examine involvement of stromal ANXA1 on dissemination, we injected intravenously B16Bl6 cells expressing luciferase gene (B16Bl6-luc) in both types of mice. Although statistical significance was not reached, we observed a tendency toward lower relative radiance in mice lungs without ANXA1 (**Figure 3G**). Altogether, these results emphasized that ANXA1 from stromal cells is important for both melanoma development and dissemination *in vivo*.

Molecular mechanisms involved in melanoma growth and spreading related to ANXA1 stromal content

We first observed a decrease in proliferation of KO mice tumors which displayed a low but significant decrease of Ki67 positive nuclei compared to those of WT mice (**Figure 4A**). This finding can explain the smaller tumors in KO mice (**Figure 3B and 3C**) and indicated that stromal ANXA1 might stimulate tumor proliferation. The differences in development and lung metastases formation between WT and KO mice could also be explained by angiogenesis modifications. We then performed the analysis of CD31 endothelial marker and VEGF dosage on tumors (**Figure 4B and 4C**). Tumors of KO mice tend to have less vessels than WT mice tumors as shown by CD31 labelling (**Figure 4B**). Moreover, VEGF was significantly increased in WT mice tumors (**Figure 5C**). These findings showed that tumor angiogenesis was reduced in mice lacking *Anxa1* expression. Hence, stromal ANXA1 seems to be a stimulating tumor angiogenesis factor.

Absence of stromal ANXA1 is associated with increased immune infiltrate

Several markers of immune cells were analyzed by RT-qPCR in B16Bl6 tumors of WT and KO mice. As illustrated in **Figure 5A**, KO mice tumors presented significantly more abundant leukocyte infiltrates compared to those of WT mice, as shown by overexpression of CD45 marker. No difference was observed for macrophage marker ADRE1 also called EMR1 or F4/80 between the two types of tumors (not shown and available over request). However, T lymphocyte marker CD3 was higher in melanoma tumors developed in KO mice relative to those developed in WT mice (**Figure 5B**). To further analyze this clue, we examined genes expressed by cytotoxic and pro-tumoral lymphocytes. Unexpectedly, both pro- and anti-tumor cells were significantly enriched in tumor of KO mice. Actually, regulatory T cells (Treg) markers (CD4 and FoxP3) were more abundant in B16Bl6 tumors developed in KO mice as well as cytotoxic (CD8a) and natural killer (NK) lymphocytes (NKp46) markers (**Figure 5C and 5D**). Furthermore, cytotoxic factors released by these latter, granzyme B (GRZB) and interferon gamma (IFN γ) were also over-represented in tumor of KO mice compared to those of WT mice (**Figure 5D**). Altogether, these results suggested that absence of stromal ANXA1 generates a non-specific influx of immune cells, especially lymphocytes, in melanoma tumor.

Discussion

ANXA1 expression has arisen a great interest as a biomarker in oncology. Despite numerous studies, its exact role in mechanisms leading to tumor development and dissemination remains unclear and sometimes controversial [20]. Hence, we focused our study to better understand specific involvement of tumor and non-tumor ANXA1 in melanoma progression *in vitro* and *in vivo*. We indeed previously showed that ANXA1 is overexpressed in melanoma cell lines compared to melanocytes [12, 21]. Here we demonstrated on two additional cell lines SK-MEL-28 and A375-MA2 presenting high level of ANXA1 the complexity of its role. If proliferation is affected by ANXA1 siRNA transfection in both cell lines, migration assays provided cell-dependent results. Indeed, siANXA1 limited only the migration of SK-MEL-28 and not that of A375-MA2, while the Ac2-26 peptide only enhanced the migration of A375-MA2. As SK-MEL-28 migrated faster than A375-MA2, it could be easier to observe a decline of cell migration in SK-MEL-28. Disparate results with peptide could be due to a higher presence of secreted and cleaved form of ANXA1 in SK-MEL-28 cells. Actually, the bioactive peptide secreted could compete with the exogenous peptide and limit its effects. However, in 2014, Belvedere and coworkers showed that the peptide is effective to stimulate migration of both types of cells secreting or not ANXA1 (MIA PaCa-2 and PANC-1 cells respectively) [22]. In both case, FPR1 receptors were present. Our CMF analysis of FPR2 expression revealed that SK-MEL-28 and A375-MA2 cells expressed little basal level of the receptor with around 15% (MFI=273) and 7.5% (MFI=149) of labelled cells respectively (data not shown). Several studies of expression modulation and/or peptide mimicking stimulation performed until now on migration showed a promoting role of ANXA1 on this phenomenon in pancreatic [15, 22, 23], hepatic [24], nasopharyngeal [25], lung [26], gastric [27], esophageal [28] and breast cancers [29-31]. Hence it is still important to better understand involvement of ANXA1 in melanoma migration. As far as proliferation is concerned, heterogeneous results were obtained, for example ANXA1 stimulated proliferation of lung [26] and esophageal [28] cancer cells but showed anti-proliferative effects in pancreatic [15], stomach [32], breast cancers [33, 34] and squamous cells oral carcinoma [35]. In melanoma, our results suggested that ANXA1 stimulates proliferation. Further studies should be performed to pinpoint its role in cell viability.

The B16Bl6 graft on *Anxa1* KO mice model allowed to assess the role of non-tumor ANXA1 part in tumor development and dissemination *in vivo*. We demonstrated for the first time that stromal ANXA1 is important for both tumor growth and metastases formation in B16Bl6 model. Actually, absence of ANXA1 in host generated significant decrease of tumor proliferation and vascularization associated with increased immune infiltrate. We hypothesized that the weakest tumor vascularization in absence

of stromal ANXA1 is responsible for both limited development and lung metastases formation. Indeed, tumor cells need oxygen and nutrients to grow and a dissemination way to reach secondary organs. In 2009, Yi and Schnitzer reported differential vessel density between B16 tumors (without ANXA1 expression) developed in WT or in *Anxa1* KO mice associated with decreased tumor volumes and increased necrosis [17]. Increase of tumor immune infiltrate in KO mice seems to be a consequence of a leaky vasculature more than a direct action of lack of stromal ANXA1 on immune cells. In fact, both anti- and pro-tumoral immune cells are upregulated in tumors of KO mice. It is well known that tumor vessels are more leaky compared to normal vessels [36]. Moreover, Cristante and colleagues highlighted importance of ANXA1 in paracellular permeability of brain endothelial cells [37]. Human brain endothelial cells which did not express ANXA1 had a higher paracellular permeability than those which expressed the protein. This increase of permeability is associated with decreased expression of junction proteins such as occludin and VE-Cadherin [37]. It would be relevant in future study to compare endothelial junction protein patterns between tumors of WT and KO mice. Given the tumor reduction and limited metastases formation, we supposed that anti-tumor immune cells are abundant enough to contain tumor proliferation and dissemination. Involvement of stromal ANXA1 in tumor dissemination was also reported in other types of cancer with *Anxa1* KO animal models such as for lung [17] and breast cancers [16, 38]. In these models, absence of ANXA1 in host limited metastases development as in present melanoma model. However, results concerning tumor volumes are more heterogeneous. In syngeneic models of melanoma [17], lung [17] and breast cancer [16], absence of stromal ANXA1 decreased tumor volumes. But in breast cancers chemically induced [39] or in spontaneous model [38], absence of stromal ANXA1 increased tumor volumes. Taken together these results confirmed that ANXA1 from non-tumor cells is important for both tumor development and metastases in syngenic models. On the other hand, studies with WT mice grafted with tumor cells *Anxa1* KO or depleted for ANXA1 showed that tumor ANXA1 was only involved in metastases and stimulated their formation. This was shown in pancreas [15], stomach [27], breast [14] and nasopharyngeal cancers [25]. Our team has also previously showed by intra-tumoral injection of siANXA1 in B16Bl6 tumors, that ANXA1 from tumor cells stimulated lung metastases formation [12]. The main issue about the role of ANXA1 in tumors and specifically in melanomas remains to clearly assess the role of this anti-inflammatory protein in tumor progression according to its tumor and non-tumor localization. Generation of specific and stable ANXA1 KO cells by CRISPR-Cas9 technology may help to confirm involvement of tumoral ANXA1 in metastases formation.

In summary, our study reported new insights in tumor and non-tumor ANXA1 in melanoma progression. If the role of tumor ANXA1 requires further analyses, stromal ANXA1 is clearly involved in

both melanoma development and metastases *in vivo*, possibly through angiogenesis modulation. These findings sustain the interest in studying ANXA1 role and potential targeting in melanoma.

Acknowledgements

We express our gratitude to Ms Christelle Blavignac, from Cell Imaging Center of Clermont Auvergne University, and Ms Christelle Damon-Soubeyrand, from histopathology platform (Anipath, GReD), for the assistance in flow-cytometry and immunofluorescence assays respectively.

References

- [1] Perretti M and D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 62-70.
- [2] McArthur S, Juban G, Gobbetti T, Desgeorges T, Theret M, Gondin J, Toller-Kawahisa JE, Reutelingsperger CP, Chazaud B, Perretti M and Mounier R. Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *J Clin Invest* 2020; 130: 1156-1167.
- [3] D'Acquisto F. On the adaptive nature of annexin-A1. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 521-528.
- [4] Tzelepis F, Verway M, Daoud J, Gillard J, Hassani-Ardakani K, Dunn J, Downey J, Gentile ME, Jaworska J, Sanchez AM, Nedelec Y, Vali H, Tabrizian M, Kristof AS, King IL, Barreiro LB and Divangahi M. Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Invest* 2015; 125: 752-768.
- [5] Baracco EE, Stoll G, Van Endert P, Zitvogel L, Vacchelli E and Kroemer G. Contribution of annexin A1 to anticancer immunosurveillance. *Oncoimmunology* 2019; 8: e1647760.
- [6] Baracco EE, Petrazzuolo A and Kroemer G. Assessment of annexin A1 release during immunogenic cell death. *Methods Enzymol* 2019; 629: 71-79.
- [7] Rouanet J, Benboubker V, Akil H, Hennino A, Auzeloux P, Besse S, Pereira B, Delorme S, Mansard S, D'Incan M, Degoul F and Rouzairé PO. Immune checkpoint inhibitors reverse tolerogenic mechanisms induced by melanoma targeted radionuclide therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2020; 69: 2075-2088.
- [8] Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L and Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 97-111.
- [9] Foo SL, Yap G, Cui J and Lim LHK. Annexin-A1 - A Blessing or a Curse in Cancer? *Trends Mol Med* 2019; 25: 315-327.
- [10] Tu Y, Johnstone CN and Stewart AG. Annexin A1 influences in breast cancer: Controversies on contributions to tumour, host and immunoediting processes. *Pharmacol Res* 2017; 119: 278-288.
- [11] Rondepierre F, Bouchon B, Papon J, Bonnet-Duquennoy M, Kintossou R, Moins N, Maublant J, Madelmont JC, D'Incan M and Degoul F. Proteomic studies of B16 lines: involvement of annexin A1 in melanoma dissemination. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794: 61-69.
- [12] Boudhraa Z, Rondepierre F, Ouchchane L, Kintossou R, Trzeciakiewicz A, Franck F, Kanitakis J, Labeille B, Joubert-Zakeyeh J, Bouchon B, Perrot JL, Mansard S, Papon J, Dechelotte P, Chezal

- JM, Miot-Noirault E, Bonnet M, D'Incan M and Degoul F. Annexin A1 in primary tumors promotes melanoma dissemination. *Clin Exp Metastasis* 2014; 31: 749-760.
- [13] Boudhraa Z, Bouchon B, Viallard C, D'Incan M and Degoul F. Annexin A1 localization and its relevance to cancer. *Clin Sci (Lond)* 2016; 130: 205-220.
- [14] de Graauw M, van Miltenburg MH, Schmidt MK, Pont C, Lalai R, Kartopawiro J, Pardali E, Le Devedec SE, Smit VT, van der Wal A, Van't Veer LJ, Cleton-Jansen AM, ten Dijke P and van de Water B. Annexin A1 regulates TGF-beta signaling and promotes metastasis formation of basal-like breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 6340-6345.
- [15] Belvedere R, Bizzarro V, Forte G, Dal Piaz F, Parente L and Petrella A. Annexin A1 contributes to pancreatic cancer cell phenotype, behaviour and metastatic potential independently of Formyl Peptide Receptor pathway. *Sci Rep* 2016; 6: 29660.
- [16] Moraes LA, Kar S, Foo SL, Gu T, Toh YQ, Ampomah PB, Sachaphibulkij K, Yap G, Zharkova O, Lukman HM, Fairhurst AM, Kumar AP and Lim LHK. Annexin-A1 enhances breast cancer growth and migration by promoting alternative macrophage polarization in the tumour microenvironment. *Sci Rep* 2017; 7: 17925.
- [17] Yi M and Schnitzer JE. Impaired tumor growth, metastasis, angiogenesis and wound healing in annexin A1-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 17886-17891.
- [18] Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, Testa JE and Schnitzer JE. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 2004; 429: 629-635.
- [19] Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ, Roviezzo F, Yona S, Paul-Clark MJ, Gavins FN, Perretti M, Morris JF, Buckingham JC and Flower RJ. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J* 2003; 17: 253-255.
- [20] Fu Z, Zhang S, Wang B, Huang W, Zheng L and Cheng A. Annexin A1: A double-edged sword as novel cancer biomarker. *Clin Chim Acta* 2020; 504: 36-42.
- [21] Caputo E, Maiorana L, Vasta V, Pezzino FM, Sunkara S, Wynne K, Elia G, Marincola FM, McCubrey JA, Libra M, Travali S and Kane M. Characterization of human melanoma cell lines and melanocytes by proteome analysis. 2011; 10: 2924-2936.
- [22] Belvedere R, Bizzarro V, Popolo A, Dal Piaz F, Vasaturo M, Picardi P, Parente L and Petrella A. Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. *BMC Cancer* 2014; 14: 961.
- [23] Pessolano E, Belvedere R, Bizzarro V, Franco P, Marco I, Petrella F, Porta A, Tosco A, Parente L, Perretti M and Petrella A. Annexin A1 Contained in Extracellular Vesicles Promotes the Activation of Keratinocytes by Mesoglycan Effects: An Autocrine Loop Through FPRs. *Cells* 2019; 8:
- [24] Lin Y, Lin G, Fang W, Zhu H and Chu K. Increased expression of annexin A1 predicts poor prognosis in human hepatocellular carcinoma and enhances cell malignant phenotype. *Med Oncol* 2014; 31: 327.
- [25] Zhu JF, Huang W, Yi HM, Xiao T, Li JY, Feng J, Yi H, Lu SS, Li XH, Lu RH, He QY and Xiao ZQ. Annexin A1-suppressed autophagy promotes nasopharyngeal carcinoma cell invasion and metastasis by PI3K/AKT signaling activation. *Cell Death Dis* 2018; 9: 1154.
- [26] Guan X, Fang Y, Long J and Zhang Y. Annexin 1-nuclear factor-kappaB-microRNA-26a regulatory pathway in the metastasis of non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer* 2019; 10: 665-675.
- [27] Cheng TY, Wu MS, Lin JT, Lin MT, Shun CT, Huang HY, Hua KT and Kuo ML. Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway. *Cancer* 2012; 118: 5757-5767.
- [28] Han G, Lu K, Huang J, Ye J, Dai S, Ye Y and Zhang L. Effect of Annexin A1 gene on the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells and its regulatory mechanisms. *Int J Mol Med* 2017; 39: 357-363.
- [29] Vecchi L, Alves Pereira Zoia M, Goss Santos T, de Oliveira Beserra A, Colaco Ramos CM, Franca Matias Colombo B, Paiva Maia YC, Piana de Andrade V, Teixeira Soares Mota S, Goncalves de

- Araujo T, Van Petten de Vasconcelos Azevedo F, Soares FA, Oliani SM and Goulart LR. Inhibition of the AnxA1/FPR1 autocrine axis reduces MDA-MB-231 breast cancer cell growth and aggressiveness in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018; 1865: 1368-1382.
- [30] Bhardwaj A, Ganesan N, Tachibana K, Rajapakshe K, Albarracin CT, Gunaratne PH, Coarfa C and Bedrosian I. Annexin A1 Preferentially Predicts Poor Prognosis of Basal-Like Breast Cancer Patients by Activating mTOR-S6 Signaling. *PLoS One* 2015; 10: e0127678.
- [31] Kang H, Ko J and Jang SW. The role of annexin A1 in expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423: 188-194.
- [32] Gao Y, Chen Y, Xu D, Wang J and Yu G. Differential expression of ANXA1 in benign human gastrointestinal tissues and cancers. *BMC Cancer* 2014; 14: 520.
- [33] Yuan Y, Anbalagan D, Lee LH, Samy RP, Shanmugam MK, Kumar AP, Sethi G, Lobie PE and Lim LH. ANXA1 inhibits miRNA-196a in a negative feedback loop through NF-kB and c-Myc to reduce breast cancer proliferation. *Oncotarget* 2016; 7: 27007-27020.
- [34] Bist P, Phua QH, Shu S, Yi Y, Anbalagan D, Lee LH, Sethi G, Low BC and Lim LH. Annexin-A1 controls an ERK-RhoA-NFkappaB activation loop in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 461: 47-53.
- [35] Wan YM, Tian J, Qi L, Liu LM and Xu N. ANXA1 affects cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med* 2017; 14: 5214-5218.
- [36] Lugano R, Ramachandran M and Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77: 1745-1770.
- [37] Cristante E, McArthur S, Mauro C, Maggioli E, Romero IA, Wylezinska-Arridge M, Couraud PO, Lopez-Tremoleda J, Christian HC, Weksler BB, Malaspina A and Solito E. Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 832-841.
- [38] Bist P, Leow SC, Phua QH, Shu S, Zhuang Q, Loh WT, Nguyen TH, Zhou JB, Hooi SC and Lim LH. Annexin-1 interacts with NEMO and RIP1 to constitutively activate IKK complex and NF-kappaB: implication in breast cancer metastasis. *Oncogene* 2011; 30: 3174-3185.
- [39] Ang EZ, Nguyen HT, Sim HL, Putti TC and Lim LH. Annexin-1 regulates growth arrest induced by high levels of estrogen in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 266-274.

Tables

Table 1. List of primers used in RT-qPCR studies

| Genes | Forward primers 5' to 3' | Reverse primers 5' to 3' | Amplicon size (bp) | Annealing temperature (°C) |
|--------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| <i>Cd45</i> | ATGGTCCTCTGAATAAAGCCCA | TCAGCACTATTGGTAGGCTCC | 70 | 60 |
| <i>Cd3</i> | ATATCTCATTGCGGGACAGG | TCTGGGTGCTGGATAGAAGG | 196 | 57 |
| <i>Cd8a</i> | CTTGTGCCTCAAAGTCAAG | CCGCTAAAGGCAGTTCTCC | 100 | 58 |
| <i>Grzb</i> | GCTGCTCACTGTGAAGGAAGT | TGGGAATGCATTTTACCAT | 107 | 58 |
| <i>Ifng</i> | AAAGAGATAATCTGGCTCTGC | GCTCTGAGACAATGAACGCT | 229 | 57 |
| <i>Nkp46</i> | ACACTACTCATCACAGGAGGTGTT | GTTGAAAGGTCAAAGTCCCAAT | 92 | 60 |
| <i>Cd4</i> | GCGAGAGTTCCAGAAGAAG | AAACGATCAAAGTCCGAAGG | 126 | 58 |
| <i>Foxp3</i> | CACCTGGAAGAATGCCATC | AGGGATTGGAGCACTTGTTG | 146 | 57 |
| <i>Tbp</i> | CCTTGTAACCTTCACCAATGAC | ACAGCCAAGATTCACGGTAGA | 59 | 59 |

Figure legends

Figure 1. Comparison of total and secreted level of ANXA1 in different human cell lines. (A) RT-qPCR analysis of ANXA1 in human melanoma cell lines. UBC was used as housekeeping gene and SK-MEL-3 as reference. (B) Western blot analysis of ANXA1 in cell lysates and supernatants of human cells treated or not with the calcium chelator EGTA (2 mM). Total proteins were used as a loading control. Full length ANXA1 (37 kDa) and cleaved form (33 kDa) were detected. (C) Flow cytometry analysis of total and membrane ANXA1. Results represent percentage of labelled cells (*MFI*).

Figure 2. ANXA1 influences cell proliferation and migration. (A, E) Cytotoxicity analysis at 48 h and 72 h after cell transfection (siANXA1 or siCTRL). (B, F) PCNA level assessed using western blot to evaluate proliferation at 48 h (B) and 72 h (F) post-transfection. Total proteins were used as a loading control. (C, D, G, H) Migration abilities analysis of cells transfected with control or ANXA1 siRNA (C, G) or treated or not with Ac2-26 peptide (10 μ M) (D, H). Percentage of wound closure \pm standard deviation is indicated below the photos and were measured as described in methods sections. All experiments were repeated at least three times. Statistical significance was determined using Mann Whitney test (A, C-E, G, H) and one sample t-test (B, F) was realized with $H_a: \mu=1$ as hypothetical, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$; ns, not significant.

Figure 3. Stromal ANXA1 depletion limits melanoma tumor growth and metastasis. B16Bl6 cells were injected subcutaneously in the flank of C57Bl6/J WT or *Anxa1* KO mice. (A) The percentage of mice presenting a measurable tumor was determined for tumor establishment at day 9 and 12 after cell injection. (B) Evolution of tumor volume. Measurements were realized three times a week using a caliper as described in method section. (C) Tumor weight at day 19 post cell injection. (D) Evolution of tumor growth. (E) Percentage of mice presenting lung surfaces metastasis. (F) Number of lung metastasis. The data group two independent experiments, the first with 19 WT and 15 KO mice and the second with 10 WT and 10 KO mice. Statistical significance was determined using Chi-square (A, E) and Mann Whitney's test (B-D, F), * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$. (G) B16Bl6-luc cells were injected intravenously in the caudal vein of C57Bl6 WT (n=5) or KO mice (n=4). Evolution of lung radiance relative to D0 which corresponds to cell injection was monitored weekly; each line corresponds to one mouse.

Figure 4. Stromal ANXA1 depletion reduces B16Bl6 tumor proliferation and angiogenesis. (A) Immunofluorescence labelling was used to detect Ki-67 and assess tumor proliferation. Dot blot represents the percentage of nuclei labelled with Ki-67 and group two different experiments together, each with 5 tumors of WT and 5 of KO mice. (B) Immunofluorescence labelling was used to detect CD31 and assess tumor vessel density (WT n=5, KO n=5). Dot blot represents the number of vessels estimated from tumor slice. (A, B) Nuclei were labelled using Hoechst 33342 solution and merge images from three tumors are presented. Image represents a 4x4 mosaic realized at x20 magnification, bars are equivalent to 50 μm (A, zoom) and 200 μm (B). (C) VEGF level in B16Bl6 tumors of WT (n=13) and KO mice (n=12) was determined using ELISA assay. Dot blot represents mean \pm standard deviation. Student's t-test with Welch's correction was realized to assess statistical significance, *p<0.05.

Figure 5. Stromal ANXA1 depletion increases B16Bl6 tumors lymphocyte infiltrates. RT-qPCR analysis of different immune cell markers of leucocytes (A), T cells (B), regulatory T cells (C), and cytotoxic cells with its cytotoxic factors granzyme B (GRZB) and interferon gamma (IFNg) (D). Mann Whitney statistical tests were realized, *p<0.05.

Figures

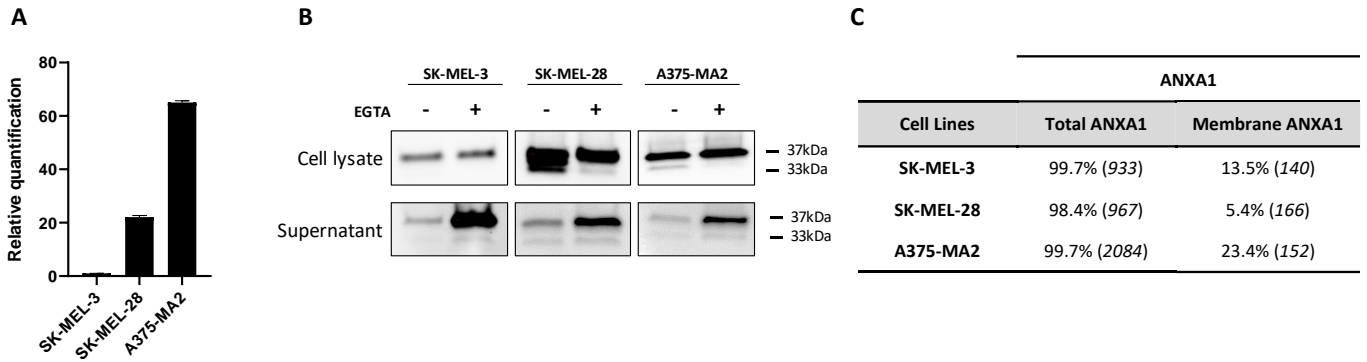


Figure 1.

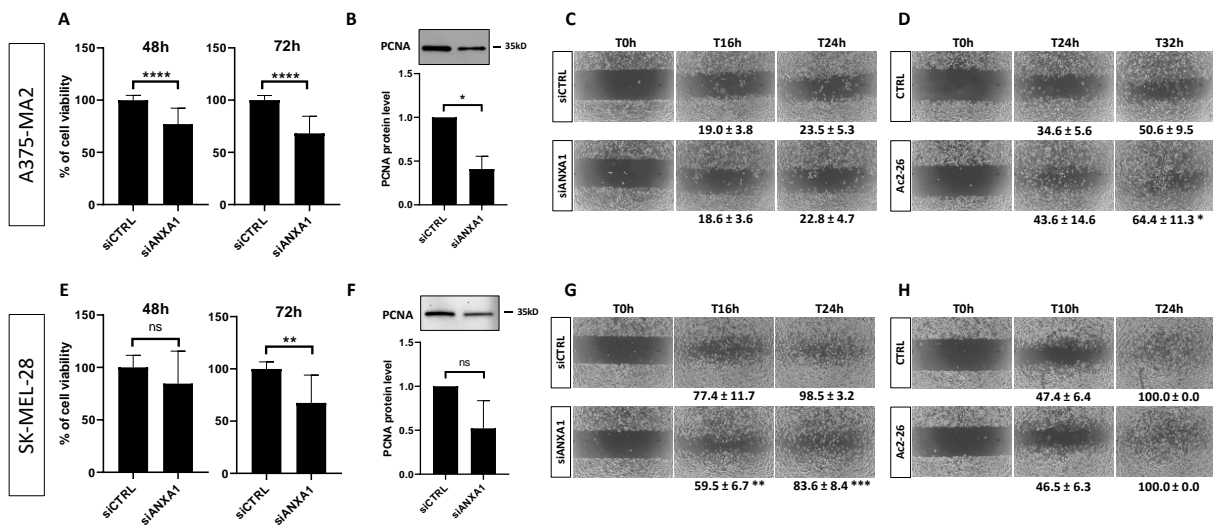


Figure 2.

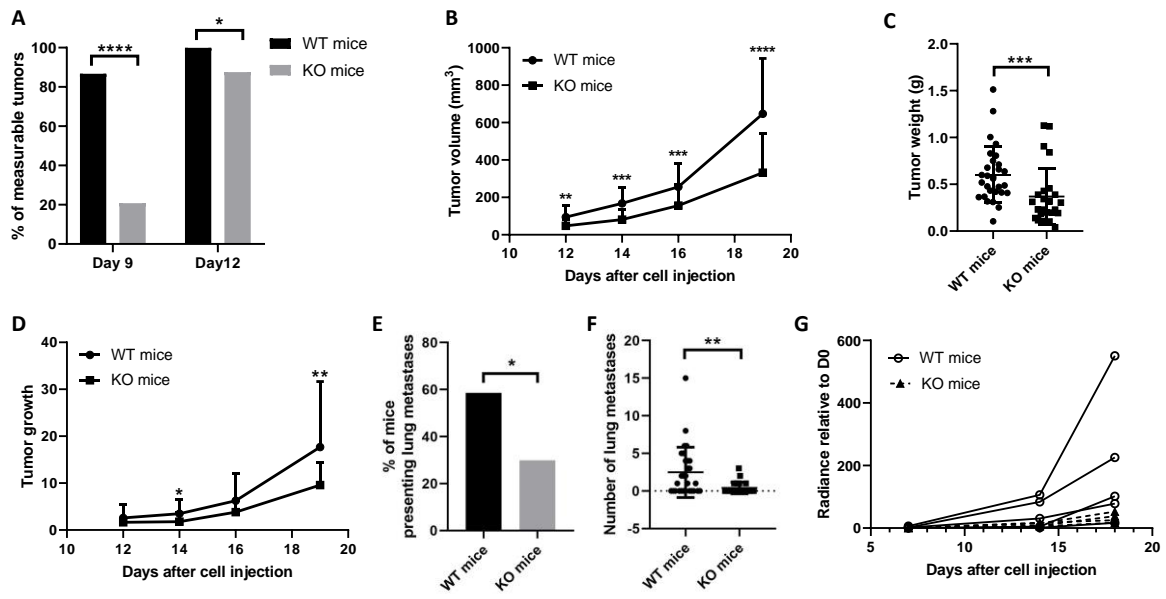


Figure 3.

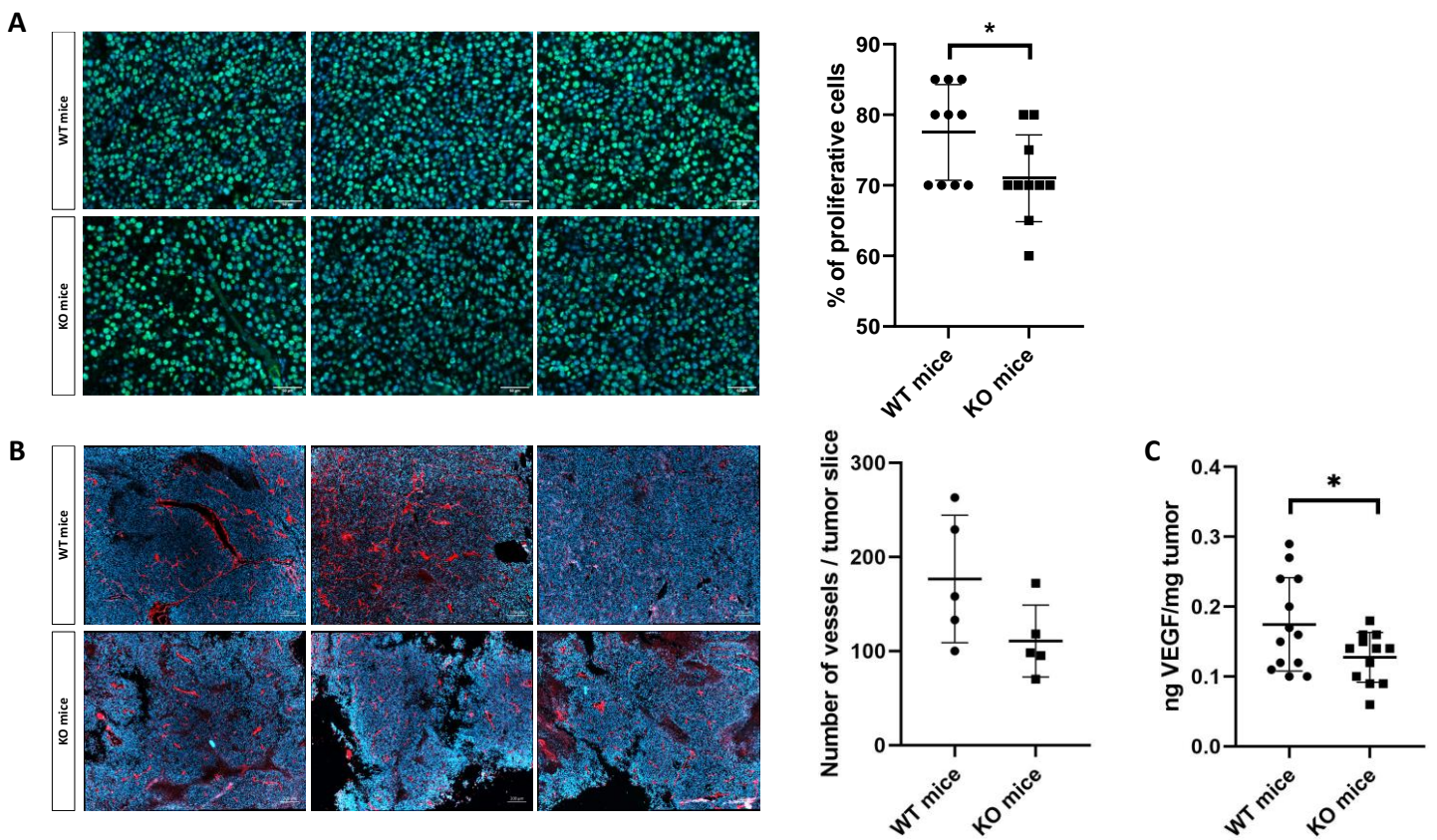


Figure 4.

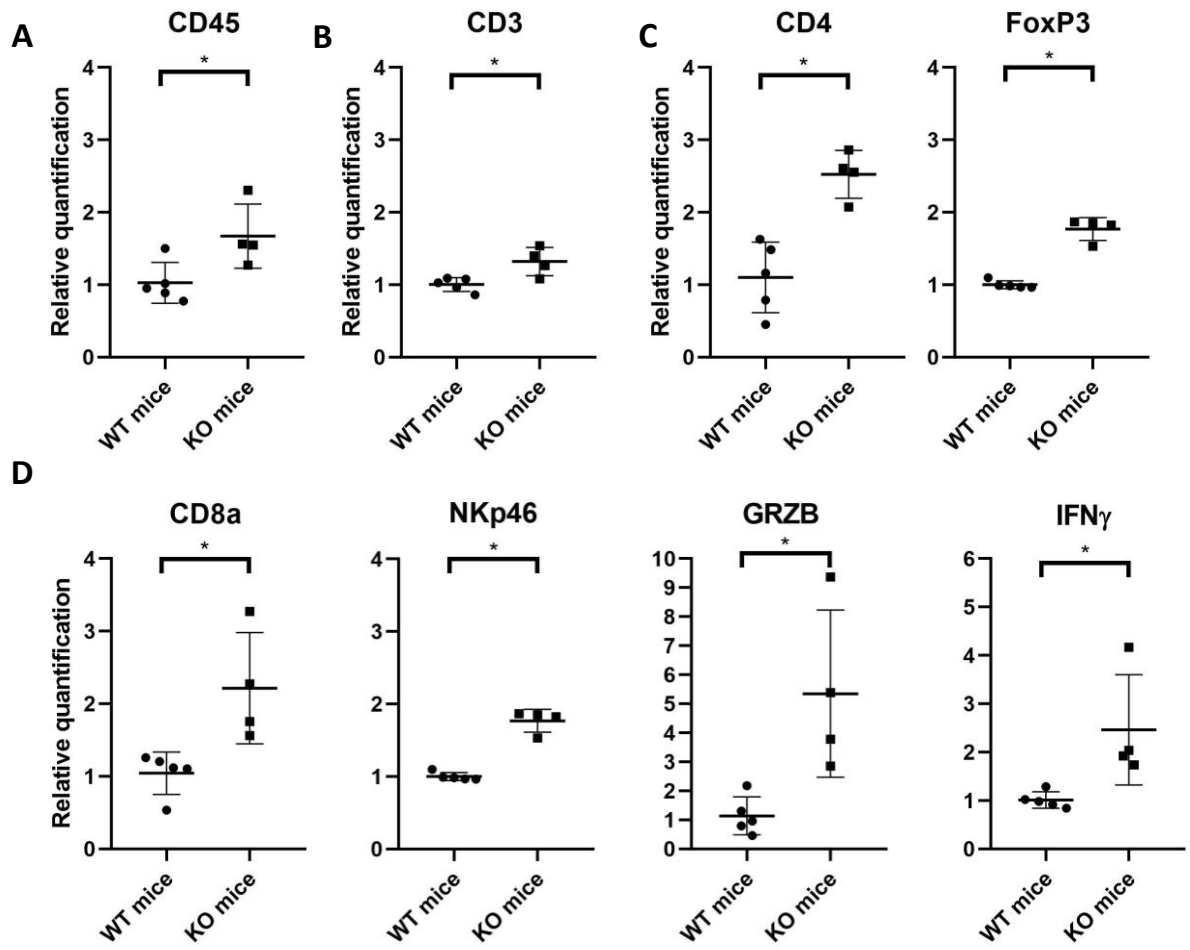


Figure 5.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le cancer est à l'heure actuelle un problème de santé publique mondial. En effet un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie [279]. Selon l'INCa, près de 157 000 décès dus au cancer ont été recensés en France en 2018. Beaucoup d'études se consacrent donc à identifier et valider de nouvelles cibles thérapeutiques et diagnostiques (théranostiques) afin d'améliorer la prise en charge des cancers.

L'ANXA1 présente un réel intérêt en oncologie puisque son expression est dérégulée dans une grande variété de tumeurs. De plus, de nombreuses études modulant son expression ont mis en évidence l'implication de l'ANXA1 des cellules cancéreuses dans la progression tumorale *in vitro* et *in vivo* [104], [111], [114], [118]–[120], [161], [171], [196], [199]. Cependant l'expression et l'action de cette protéine sont dépendantes du type de tissu, et pour certains, des données contradictoires ont été publiées [17], [96]. A l'heure actuelle, il n'existe donc pas de réel consensus quant au rôle de l'ANXA1 dans les cancers en général. Cependant la surexpression de l'ANXA1, associée à une action pro-tumorale dans certaines tumeurs, soutient les projets de ciblage fonctionnel de cette protéine. C'est notamment le cas pour le CSTN et le mélanome auxquels s'intéresse l'UMR1240. En effet, l'ANXA1 est surexprimée dans les CSTN par rapport aux autres sous-types de tumeurs mammaires [158]–[160] et dans les mélanomes par rapport aux mélanocytes [196]. De plus, l'expression de l'ANXA1 au niveau des tumeurs est associée à une diminution de la survie globale dans les cancers du sein dont les CSTN [161]–[163] et de la survie sans métastases dans le mélanome [196]. Le ciblage de l'ANXA1 tumorale est donc pertinent dans ces deux types de cancers, d'autant plus que de précédents travaux ont mis en évidence le rôle stimulateur de la protéine dans la prolifération [168], la migration, l'invasion [169], [280] et la TEM [158], [175] pour le CSTN et l'invasion pour le mélanome [196], [199].

Cependant, le ciblage de l'ANXA1 est complexifié par différents paramètres. Dans un premier temps, l'ANXA1 peut avoir différentes localisations cellulaires : nucléaire, cytosolique, membranaire, et peut également être sécrétée dans le milieu environnant. En fonction de sa localisation, ses modes d'actions et ses effets peuvent être différents. L'ANXA1 extracellulaire est par exemple largement associée à des effets anti-inflammatoires et agit par l'intermédiaire de l'interaction de son domaine Nter avec les récepteurs FPR [5], [62], [70]. Dans un second temps, l'ANXA1 peut subir des modifications post-traductionnelles au niveau de ce domaine, qui peuvent moduler à la fois sa localisation et sa fonction comme le clivage protéolytique par exemple. Ce dernier a lieu une fois la protéine externalisée et peut limiter [72] ou favoriser [170] son action. Plusieurs études menées à l'aide du peptide Ac2-26 ont d'ailleurs montré que la partie Nter de l'ANXA1 est capable de stimuler la migration et/ou l'invasion de cellules tumorales pancréatiques [121], prostatiques [138], de mélanome [196] et de CSTN [169], soulignant ainsi un effet pro-tumoral potentiel de l'ANXA1 extracellulaire. Pour finir, l'ANXA1 est exprimée au niveau de différents types de cellules comme les cellules épithéliales,

endothéliales [259]–[261], [278] ou encore les cellules immunitaires [61] et peut donc moduler à la fois les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement. Il est aujourd’hui bien décrit que le microenvironnement est capable de moduler l’évolution des tumeurs et que les cellules tumorales vont elles-mêmes favoriser la mise en place d’un environnement favorable à leur développement et leur dissémination. Des études menées grâce à des souris invalidées pour le gène codant l’*Anxa1* ont permis de montrer que son expression au niveau des cellules stromales (non tumorales) est capable de favoriser le développement tumoral et dans certains cas la formation de métastases dans des modèles de cancers du sein [174], [247], du poumon et de mélanome [246].

C’est dans ce contexte que s’est inscrit ce travail de thèse « ANXA1, dissémination et microenvironnement tumoral » qui a consisté à étudier l’implication de l’ANXA1 dans la progression tumorale, en se focalisant sur certaines localisations de la protéine (extracellulaire, tumorale et stromale).

Le premier objectif a été de déterminer le rôle de l’ANXA1 extracellulaire dans l’agressivité tumorale du CSTN et du mélanome. Dans un premier temps, une étude de caractérisation de l’expression de l’ANXA1 totale, membranaire et sécrétée (extracellulaire) a été réalisée par différentes techniques. Cette étude a permis de confirmer pour la lignée MDA-MB-231-luc [169] et de montrer pour la première fois pour les lignées SK-MEL-3, SK-MEL-28 et A375-MA2 la présence d’ANXA1 extracellulaire (membranaire et sécrétée) sous forme totale et clivée. Dans un second temps, nous avons étudié l’implication de cette ANXA1 extracellulaire dans la migration cellulaire, qui est impliquée dans la dissémination tumorale. Pour cette étude, seules les cellules MDA-MB-231-luc, SK-MEL-28 et A375-MA2 présentant des capacités migratoires ont été analysées. Elles ont été incubées avec l’anticorps VJ4B6 afin de bloquer l’action de l’ANXA1 extracellulaire. Cependant, l’anticorps n’a pas permis de limiter la migration cellulaire aux concentrations testées. Plusieurs limites pourraient expliquer cette inefficacité du VJ4B6. **(i)** Comme déjà évoqué tout au long de ce manuscrit, l’ANXA1 peut être présente sous forme totale et clivée au niveau extracellulaire. L’action extracellulaire de la protéine est possible grâce au domaine Nter. Seule la protéine totale membranaire (exposition du domaine Nter) et le peptide libéré suite au clivage sont donc « actifs ». Le VJ4B6 est capable de reconnaître seulement la forme intacte de la protéine. Cependant on ne sait pas si la fixation de l’anticorps empêche le clivage de l’ANXA1. Si ce n’est pas le cas, l’activité de blocage de l’anticorps est donc partielle, ce qui pourrait expliquer son inefficacité à limiter la migration cellulaire. **(ii)** A l’heure actuelle, seuls les récepteurs FPR ont été identifiés comme médiateurs des effets extracellulaires de l’ANXA1. Toutefois, dans les lignées analysées, nous avons observé que les récepteurs FPR sont peu

exprimés. Cette observation ne favorise donc pas une action extracellulaire de l'ANXA1. Cependant, l'ANXA1 extracellulaire issue des cellules tumorales pourrait plutôt agir sur les cellules du microenvironnement, notamment les cellules du système immunitaire qui expriment les récepteurs FPR notamment FPR2 [61]. Nous avons donc réalisé une étude du VJ4B6 *in vivo*. Les cellules murines B16Bl6 ont été injectées en sous-cutané à des souris C57Bl6/J WT ou KO pour *Anxa1*. Dans le contexte KO, le VJ4B6 cible uniquement l'ANXA1 issue des cellules tumorales alors que dans le contexte sauvage il peut également cibler celle issue des cellules du microenvironnement. Cependant, dans les deux types de souris, le VJ4B6 n'a pas eu d'effet sur la croissance tumorale et sur la formation de métastases pulmonaires. A nouveau, plusieurs limites peuvent être soulignées dans cette étude et s'ajoutent à celles déjà évoquées précédemment. **(iii)** Afin de prendre en compte le microenvironnement immunitaire, un modèle syngénique a dû être utilisé. Néanmoins, au vu de l'étude de caractérisation, la lignée murine B16Bl6 présente peu d'ANXA1 extracellulaire ce qui limite le ciblage par le VJ4B6. **(v)** Il est également possible que la reconnaissance de la forme murine de la protéine par l'anticorps soit inférieure à celle de la forme humaine. En effet l'anticorps a été breveté comme reconnaissant la protéine humaine même si plusieurs analyses montrent qu'il est capable de reconnaître la forme murine [270]. **(iv)** De plus, il se peut que l'accessibilité de l'anticorps (injecté en intrapéritonéal) à la tumeur soit insuffisante pour permettre une action anti-tumorale. **(v)** Pour finir, des travaux récents, rendus publics par la société Medannex montrent que l'anticorps MDX-124 (VJ4B6 humanisé) est capable de diminuer de façon significative les volumes tumoraux des souris BALB/c porteuses de tumeurs orthotopiques mammaires 4T1-luc [277]. Cependant, les concentrations utilisées dans cette étude sont bien plus importantes que celles que nous avons utilisées.

Cette étude a permis d'apporter de nouvelles données quant à la localisation de l'ANXA1 dans plusieurs lignées cellulaires de CSTN et de mélanome. Elle fut également la première étude à utiliser une stratégie de blocage de l'ANXA1 à l'aide d'un anticorps monoclonal dans le cancer du sein et le mélanome jusqu'à l'étude récente de Medannex [277]. L'utilisation des anticorps en cancérologie est particulièrement développée du fait de leur spécificité de ciblage vis à vis des protéines de surface telles que les récepteurs. Cependant, à notre connaissance, seules deux études ont mis à profit cette stratégie vis-à-vis de l'ANXA1. Une première, menée par Belvedere et ses associés a montré l'efficacité d'un anticorps anti-ANXA1 (polyclonal, 71-3400, Invitrogen) à limiter la migration des cellules cancéreuses pancréatiques MIA PaCa-2 qui expriment l'ANXA1 extracellulaire *in vitro* [121]. Dans la seconde étude, l'anticorps dirigé contre l'ANXA1 a été couplé à l'iode 125, permettant ainsi le ciblage spécifique du radionucléide au niveau de tumeurs pulmonaires induites par l'injection intraveineuse de cellules d'adénocarcinome mammaire. Les rats traités avec l'anticorps marqué présentaient une nette amélioration de leur survie par rapport aux rats ayant reçu un isotype contrôlé radiomarqué

[259]. Ces deux études soulignent le double intérêt de l'ANXA1 en oncologie qui peut à la fois constituer une cible thérapeutique directe de par ses effets pro-tumoraux et une protéine d'adressage tumoral de par sa surexpression dans certaines tumeurs. Cependant, dans nos conditions d'études, le ciblage de l'ANXA1 extracellulaire avec le VJ4B6 ne s'est pas montré efficace pour limiter la migration *in vitro* ainsi que le développement et la dissémination tumorale *in vivo*. Malgré ce constat, ce travail donne lieu à certaines perspectives, visant notamment à contourner les limites évoquées précédemment. Il semblerait dans un premier temps intéressant d'analyser les capacités du VJ4B6 à limiter ou non le clivage de l'ANXA1. En effet, une étude récente a montré l'importance du clivage de cette protéine dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de CSTN MDA-MB-231 [170]. Il serait également pertinent d'envisager le co-traitement des cellules avec le VJ4B6 qui inhibe la forme totale de l'ANXA1 et un inhibiteur du clivage de la protéine (ex : inhibiteur de la cathepsine D ou de la PR3), permettant de limiter la production du peptide bioactif non ciblé par l'anticorps. En 2018, Vecchi et ses collaborateurs ont quant à eux utilisé une autre stratégie visant à bloquer les récepteurs FPR plus spécifiquement les FPR1. Ce blocage a permis de limiter à la fois la prolifération, la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231 *in vitro* ainsi que les volumes tumoraux et la formation de métastases *in vivo* [169]. Cependant, du fait de la diversité de ligands des récepteurs FPR, il est difficile de déduire l'implication de l'ANXA1 extracellulaire, contrairement à la stratégie de ciblage avec l'anticorps. Au vu de la faible expression des FPR dans les lignées cellulaires étudiées, il serait également intéressant de stimuler les cellules tumorales avec des GC par exemple. En effet, plusieurs études ont montré leur efficacité à stimuler l'expression des FPR et de l'ANXA1 ainsi que l'externalisation de cette dernière [56], [57], [70], [281]. La supplémentation des milieux utilisés lors des expériences avec du CaCl₂ pourrait également permettre de favoriser la fixation de l'ANXA1 à la membrane plasmique et l'acquisition de sa structure active (exposition du domaine Nter) [21], [22]. Pour finir, et comme déjà discuté précédemment, des analyses visant à déterminer les concentrations permettant d'obtenir une action anti-tumorale du VJ4B6 semblent être indispensables.

Le second objectif de ces travaux de thèse a été de déterminer le rôle de l'ANXA1 tumorale et stromale dans la progression du mélanome. En effet, peu d'études ont été réalisées au niveau du mélanome sur cette thématique, contrairement au cancer du sein, et nous disposons au laboratoire d'un modèle syngénique (B16Bl6-C57Bl6/J) approprié aux analyses *in vivo* nécessitant des souris *Anxa1* KO (C57Bl6/J). Nous avons dans un premier temps évalué l'implication de l'ANXA1 tumorale dans la prolifération et la migration des cellules A375-MA2 et SK-MEL-28 grâce à l'utilisation d'ARN interférents (siRNA : siANXA1 et siCTRL). Nous avons mis pour la première fois en évidence que l'ANXA1 est capable de stimuler la prolifération des lignées cellulaires de mélanomes. Cependant,

l'effet inhibiteur du siANXA1 sur la migration n'a été observé qu'au niveau des cellules SK-MEL-28. Nous avons également utilisé le peptide Ac2-26. Contrairement aux siRNA, seule la migration des cellules A375-MA2 a été stimulée par ce dernier. Ces résultats divergents peuvent être en partie expliqués par des caractéristiques différentes des deux lignées cellulaires en terme d'expression de l'ANXA1 mais également d'origine et de capacité migratoire. La lignée SK-MEL-28 dérive d'une métastase ganglionnaire tandis que la lignée A375-MA2 dérive de la lignée A375 issue d'une tumeur primaire, ce qui peut expliquer leur différence d'agressivité *in vitro*.

Les principaux résultats de cette étude ont été obtenus au niveau de l'analyse de l'ANXA1 stromale *in vivo*. En effet, nous avons montré pour la première fois que la croissance des cellules B16Bl6, exprimant l'ANXA1, est ralentie chez les souris *Anxa1* KO par rapport aux souris WT. De plus les souris WT développent plus de métastases pulmonaires que les souris KO. L'étude de Yi et Schnitzer a également montré que les tumeurs de mélanome développées chez les souris *Anxa1* KO présentent des volumes tumoraux plus faibles. Cependant, ils ont utilisé des cellules B16 qui n'expriment pas l'ANXA1 et qui ne sont pas capables de former des métastases *in vivo*. L'étude *ex vivo* des tumeurs nous a permis de montrer que celles développées en absence d'ANXA1 environnante sont moins prolifératives et moins vascularisées que celles développées chez les souris WT. La plus faible vascularisation au niveau des tumeurs des souris KO est associée à une diminution de la quantité de VEGF, médiateur principal de l'angiogenèse. Ceci participe donc à la différence en termes de croissance et de dissémination tumorales entre les deux types de souris. Pour aller plus loin, et connaissant le rôle de l'ANXA1 dans l'immunité, nous avons également analysé l'infiltrat immunitaire des différentes tumeurs. Nous avons ainsi mis en évidence une surexpression des marqueurs immunitaires CD3, CD4, FoxP3, CD8a et NKp46 dans les tumeurs des souris KO, suggérant ainsi un infiltrat lymphocytaire plus abondant. Cependant l'absence d'ANXA1 dans le microenvironnement tumoral entraîne à la fois une augmentation des marqueurs des Treg pro-tumoraux et des cellules cytotoxiques LT CD8+ et NK. Il est aujourd'hui bien décrit que les vaisseaux tumoraux présentent des défauts caractéristiques notamment une perméabilité accrue due à la perte des jonctions cellulaires [233]. En 2013, Cristante et ses associés ont montré que l'ANXA1 est impliquée dans le maintien des jonctions cellulaires au niveau des cellules endothéliales cérébrales [278]. Il est donc possible que l'afflux lymphocytaire observé au niveau des tumeurs des souris KO soit une conséquence de l'absence d'ANXA1 au niveau des cellules endothéliales et donc une perméabilité vasculaire accrue.

Malgré des résultats hétérogènes quant au rôle de l'ANXA1 tumorale, cette étude a permis d'améliorer nos connaissances sur le rôle pro-tumoral et notamment pro-métastatique de l'ANXA1 stromale dans le contexte du mélanome. Ce travail ouvre différentes perspectives notamment l'étude du rôle de

l'ANXA1 dans la perméabilité des vaisseaux tumoraux. L'analyse de protéines impliquées dans les jonctions cellulaires telles que l'occludine ou encore la VE-Cadhérine dans les tumeurs des souris WT et KO permettrait d'estimer cette perméabilité. L'étude des cellules immunitaires tumorales par CMF ou immunohistochimie, grâce à l'utilisation de marqueurs discriminant précisément les différents types de lymphocytes, permettrait de savoir si les lymphocytes anti-tumoraux sont plus ou moins abondants que les pro-tumoraux dans les différents types de tumeurs. Il serait également intéressant d'analyser l'effet de l'ANXA1 issue des cellules tumorales sur les cellules stromales qui expriment les FPR comme les cellules immunitaires. De plus, l'utilisation de cellules B16Bl6 *Anxa1* KO générées par la technologie CRISPR/Cas9 permettrait d'étudier *in vivo* le rôle de l'ANXA1 tumorale notamment sur la formation des métastases.

L'ensemble de ce travail de thèse a donc participé à confirmer l'implication de l'ANXA1 dans l'agressivité tumorale, particulièrement dans le mélanome. Il a permis d'apporter d'importantes données quant à l'expression et à la localisation cellulaire de cette protéine dans plusieurs lignées de CSTN et de mélanome, et de souligner l'existence d'une hétérogénéité d'expression entre ces lignées. Si l'étude de l'ANXA1 extracellulaire ne s'est pas révélée concluante, nous avons montré pour la première fois dans le mélanome que l'ANXA1 des cellules tumorales est importante pour la prolifération cellulaire *in vitro*, tout comme l'ANXA1 stromale *in vivo*. De plus, cette étude a également montré que l'ANXA1 stromale est capable de stimuler la formation des métastases dans le mélanome, probablement en modulant l'angiogenèse tumorale. L'ensemble de ces résultats supporte le ciblage de cette protéine dans le mélanome mais également d'autres cancers dans lesquels l'ANXA1 est surexprimée. En effet, l'ANXA1 présente à la fois un intérêt diagnostique et thérapeutique et son ciblage pourrait permettre de bloquer à la fois sa forme tumorale et stromale, menant ainsi à limiter le développement et la dissémination de certaines tumeurs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] "Institut National du Cancer (INCa)." [Online]. Available: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Chiffres-cles>. [Accessed: 05-Oct-2020].
- [2] M. J. Geisow, J. H. Walker, C. Boustead, and W. Taylor, "Annexins-New family of Ca²⁺-regulated-phospholipid binding protein," *Biosci. Rep.*, vol. 7, no. 4, pp. 289–298, 1987.
- [3] C. E. Creutz, C. J. Pazoles, and H. B. Pollard, "Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules," *J. Biol. Chem.*, vol. 253, no. 8, pp. 2858–2866, 1978.
- [4] M. P. Fernandez and R. O. Morgan, "Structure, Function and Evolution of the Annexin Gene Superfamily," in *Annexins: biological importance and annexin-related pathologies*, Landes Bio., J. Bandorowicz-Pikula, Ed. 2003, pp. 21–37.
- [5] P. F. Han, X. Da Che, H. Z. Li, Y. Y. Gao, X. C. Wei, and P. C. Li, "Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways," *Chinese J. Traumatol. - English Ed.*, vol. 23, no. 2, pp. 96–101, 2020.
- [6] S. E. Moss and R. O. Morgan, "The annexins," *Genome Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 1–8, 2004.
- [7] R. O. Morgan and M. P. Fernández, "Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 53, no. 6, pp. 508–515, 1997.
- [8] P. D. Smith and S. E. Moss, "Structural evolution of the annexin supergene family," *Trends Genet.*, vol. 10, no. 7, p. 241, 1994.
- [9] T. Grewal, S. J. Wason, C. Enrich, and C. Rentero, "Annexins-insights from knockout mice," *Biol. Chem.*, vol. 397, no. 10, pp. 1031–1053, 2016.
- [10] M. Perretti and R. J. Flower, "Annexin 1 and the biology of the neutrophil," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 76, no. 1, pp. 25–29, 2004.
- [11] "The Human Protein Atlas." [Online]. Available: <https://www.proteinatlas.org/>. [Accessed: 17-Apr-2020].
- [12] P. Raynal and H. B. Pollard, "Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins," *BBA - Rev. Biomembr.*, vol. 1197, no. 1, pp. 63–93, 1994.
- [13] S. Liemann and A. Lewit-Bentley, "Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function," *Structure*, vol. 3, no. 3, pp. 233–237, 1995.
- [14] V. Gerke and S. E. Moss, "Annexins: From structure to function," *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 2, pp. 331–371, 2002.
- [15] J. H. Rand, "The annexinopathies: A new category of diseases," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1498, no. 2–3, pp. 169–173, 2000.
- [16] L. H. K. Lim and S. Pervaiz, "Annexin 1: the new face of an old molecule," *FASEB J.*, vol. 21, no. 4, pp. 968–975, 2007.
- [17] Z. Boudhraa, B. Bouchon, C. Viallard, M. D'Incan, and F. Degoul, "Annexin A1 localization and

its relevance to cancer," *Clin. Sci.*, vol. 130, no. 4, pp. 205–220, 2016.

- [18] "Ensembl." [Online]. Available: <https://www.ensembl.org/index.html>. [Accessed: 31-Aug-2020].
- [19] R. Huber, J. Römisch, and E. P. Paques, "The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes.," *EMBO J.*, vol. 9, no. 12, pp. 3867–3874, 1990.
- [20] X. Weng, H. Luecke, I. S. Song, D. S. Kang, S. -H Kim, and R. Huber, "Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution," *Protein Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 448–458, 1993.
- [21] A. Rosengarth, V. Gerke, and H. Luecke, "X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation," *J. Mol. Biol.*, vol. 306, no. 3, pp. 489–498, 2001.
- [22] A. Rosengarth and H. Luecke, "A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1," *J. Mol. Biol.*, vol. 326, no. 5, pp. 1317–1325, 2003.
- [23] M. R. Crompton, S. E. Moss, and M. J. Crompton, "Diversity in the Lipocortin/Calpactin Family," *Cell*, vol. 55, pp. 1–3, 1988.
- [24] S. Liemann and R. Huber, "Three-dimensional structure of annexins," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 53, no. 6, pp. 516–521, 1997.
- [25] C. W. D'Acunto, H. Gbelcova, M. Festa, and T. Ruml, "The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 1, pp. 173–178, 2014.
- [26] R. B. Pepinsky and L. K. Sinclair, "Epidermal growth factor-dependent phosphorylation of lipocortin," *Nature*, vol. 321, no. 6065, pp. 81–84, 1986.
- [27] H. T. Haigler, D. D. Schlaepfer, and W. H. Burgess, "Characterization of lipocortin I and an immunologically unrelated 33-kDa protein as epidermal growth factor receptor/kinase substrates and phospholipase A2 inhibitors.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 14, pp. 6921–6930, 1987.
- [28] L. Varticovski, S. B. Chahwala, M. Whitman, L. Cantley, D. Schindler, E. P. Chow, L. K. Sinclair, and R. B. Pepinsky, "Location of Sites in Human Lipocortin I That Are Phosphorylated by Protein Tyrosine Kinases and Protein Kinases A and C," *Biochemistry*, vol. 27, no. 10, pp. 3682–3690, 1988.
- [29] D. Caron, H. Maaroufi, S. Michaud, R. M. Tanguay, and R. L. Faure, "Annexin A1 is regulated by domains cross-talk through post-translational phosphorylation and SUMOylation," *Cell. Signal.*, vol. 25, no. 10, pp. 1962–1969, 2013.
- [30] D. D. Schlaepfer and H. T. Haigler, "In Vitro Protein Kinase C Phosphorylation Sites of Placental Lipocortin," *Biochemistry*, vol. 27, no. 12, pp. 4253–4258, 1988.
- [31] S. A. Johnstone, I. Hubaishy, and D. M. Waisman, "Regulation of annexin I-dependent aggregation of phospholipid vesicles by protein kinase C," *Biochem. J.*, vol. 294, no. 3, pp. 801–807, 1993.
- [32] F. Porte, P. De Santa Barbara, S. Phalipou, J. P. Liautard, and J. Sri Widada, "Change in the N-terminal domain conformation of annexin I that correlates with liposome aggregation is impaired by Ser-27 to Glu mutation that mimics phosphorylation," *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1293, no. 2, pp. 177–184, 1996.
- [33] E. Solito, H. C. Christian, M. Festa, A. Mulla, T. Tierney, R. J. Flower, J. C. Buckingham, E. Solito, H. C. Christian, M. Festa, A. Mulla, T. Tierney, R. J. Flower, and J. C. Buckingham, "Post-

translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface," *FASEB J.*, vol. 20, no. 9, pp. 1498–1500, 2006.

- [34] K. Lewis, S. Lindsay, and Y. Li, "A Nudged Elastic Band Study on the N-terminal Domain Conformational Pathways of Annexin A1 from a Buried State to an Exposed State," *J. Phys. Chem.*, vol. 123, no. 48, pp. 10163–10170, 2019.
- [35] M. A. Lizarbe, J. I. Barrasa, N. Olmo, F. Gavilanes, and J. Turnay, *Annexin-phospholipid interactions. Functional implications*, vol. 14, no. 2. 2013.
- [36] V. Gerke and S. E. Moss, "Annexins and membrane dynamics," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1357, no. 2, pp. 129–154, 1997.
- [37] J. W. Francis, K. J. Balazovich, J. E. Smolen, D. I. Margolis, and L. A. Boxer, "Human neutrophil annexin I promotes granule aggregation and modulates Ca²⁺-dependent membrane fusion," *J. Clin. Invest.*, vol. 90, no. 2, pp. 537–544, 1992.
- [38] P. Meers, T. Mealy, and A. I. Tauber, "Annexin I interactions with human neutrophil specific granules: fusogenicity and coaggregation with plasma membrane vesicles," *BBA - Biomembr.*, vol. 1147, no. 2, pp. 177–184, 1993.
- [39] D. Hoekstra, R. Buist-Arkema, K. Klappe, and C. P. M. Reutelingsperger, "Interaction of Annexins with Membranes: The N-Terminus as a Governing Parameter As Revealed with a Chimeric Annexin," *Biochemistry*, vol. 32, no. 51, pp. 14194–14202, 1993.
- [40] H. A. M. Andree, G. M. Willems, R. Hauptmann, I. Maurer-Fogy, M. C. A. Stuart, W. T. Hermens, P. M. Frederik, and C. P. M. Reutelingsperger, "Aggregation of Phospholipid Vesicles by a Chimeric Protein with the N-Terminus of Annexin I and the Core of Annexin V," *Biochemistry*, vol. 32, no. 17, pp. 4634–4640, 1993.
- [41] A. Rosengarth, A. Wintergalen, H. J. Galla, H. J. Hinz, and V. Gerke, "Ca²⁺-independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers," *FEBS Lett.*, vol. 438, no. 3, pp. 279–284, 1998.
- [42] Y. B. Hu, E. B. Dammer, R. J. Ren, and G. Wang, "The endosomal-lysosomal system: From acidification and cargo sorting to neurodegeneration," *Transl. Neurodegener.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–10, 2015.
- [43] E. Bitto and W. Cho, "Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I," *Biochemistry*, vol. 38, no. 42, pp. 14094–14100, 1999.
- [44] A. Lewit-Bentley, S. Réty, J. Sopkova-de Oliveira Santos, and V. Gerke, "S100-annexin complexes: Some insights from structural studies," *Cell Biol. Int.*, vol. 24, no. 11, pp. 799–802, 2000.
- [45] A. C. Dempsey, M. P. Walsh, and G. S. Shaw, "Unmasking the annexin I interaction from the structure of apo-S100A11," *Structure*, vol. 11, no. 7, pp. 887–897, 2003.
- [46] S. R. Donnelly and S. E. Moss, "Annexins in the secretory pathway," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 53, no. 6, pp. 533–538, 1997.
- [47] C. E. Futter, S. Felder, J. Schlessinger, A. Ullrich, and C. R. Hopkins, "Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor," *J. Cell Biol.*, vol. 120, no. 1, pp. 77–83, 1993.
- [48] J. Seemann, K. Weber, M. Osborn, R. G. Parton, and V. Gerket, "The Association of Annexin I with Early Endosomes Is Regulated by Ca²⁺ and Requires an Intact N-Terminal Domain," *Mol. Biol. Cell*, vol. 7, no. September, pp. 1359–1374, 1996.

- [49] U. Rescher, N. Zobiack, and V. Gerke, "Intact Ca²⁺-binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells," *J. Cell Sci.*, vol. 113, no. 22, pp. 3931–3938, 2000.
- [50] T. Grewal and C. Enrich, "Annexins - Modulators of EGF receptor signalling and trafficking," *Cell. Signal.*, vol. 21, no. 6, pp. 847–858, 2009.
- [51] I. J. White, L. M. Bailey, M. R. Aghakhani, S. E. Moss, and C. E. Futter, "EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation," *EMBO J.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–12, 2006.
- [52] D. M. Patel, S. F. Ahmad, D. G. Weiss, V. Gerke, and S. A. Kuznetsov, "Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis," *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. 4, pp. 578–588, 2011.
- [53] M. Ohnishi, Y. Tai, R. Konishi, J. Takahara, and O. Hatase, "Involvement of Annexin-1 in Glucose-Induced Insulin Secretion in Rat Pancreatic Islets," *Society*, vol. 136, no. 6, 2007.
- [54] D. D. Chaplin, "Overview of the Immune Response," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, 2010.
- [55] R. Hannon, J. D. Croxtall, S. J. Getting, F. Roviezzo, S. Yona, M. J. Paul-Clark, F. N. E. Gavins, M. Perretti, J. F. Morris, J. C. Buckingham, and R. J. Flower, "Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1^{-/-} mouse," *FASEB J.*, vol. 17, no. 2, pp. 253–255, 2003.
- [56] E. Solito, A. Mulla, J. F. Morris, H. C. Christian, R. J. Flower, and J. C. Buckingham, "Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and ," *Endocrinology*, vol. 144, no. 4, pp. 1164–1174, 2003.
- [57] M. Perretti and F. D'Acquisto, "Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 1, pp. 62–70, 2009.
- [58] N. J. Goulding, J. L. Godolphin, P. R. Sharland, P. J. Maddison, M. Sampson, S. H. Peers, and R. J. Flower, "Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone," *Lancet*, vol. 335, no. 8703, pp. 1416–1418, 1990.
- [59] A. Mulla, C. LeRoux, E. Solito, and J. C. Buckingham, "Correlation between the antiinflammatory protein annexin 1 (lipocortin 1) and serum cortisol in subjects with normal and dysregulated adrenal function," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, no. 1, pp. 557–562, 2005.
- [60] F. D'Acquisto, N. Paschalidis, K. Raza, C. D. Buckley, R. J. Flower, and M. Perretti, "Glucocorticoid treatment inhibits annexin-1 expression in rheumatoid arthritis CD4⁺ T cells," *Rheumatology*, vol. 47, no. 5, pp. 636–639, 2008.
- [61] L. Spurr, S. Nadkarni, M. Pederzoli-Ribeil, N. J. Goulding, M. Perretti, and F. D'Acquisto, "Comparative analysis of Annexin A1-formyl peptide receptor 2/ALX expression in human leukocyte subsets," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 11, no. 1, pp. 55–66, 2011.
- [62] F. N. E. Gavins and M. J. Hickey, "Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity," *Front. Immunol.*, vol. 3, no. NOV, pp. 1–11, 2012.
- [63] E. Solito, C. Raguene-Nicol, C. De Coupade, A. Bisagni-Faure, and F. Russo-Marie, "U937 cells deprived of endogenous annexin 1 demonstrate an increased PLA₂ activity," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 124, no. 8, pp. 1675–1683, 1998.
- [64] B. C. Bastian, C. Sellert, A. Seekamp, J. Römisch, E. P. Pâques, and E. B. Bröcker, "Inhibition of human skin phospholipase A₂ by 'lipocortins' is an indirect effect of substrate/lipocortin

- interaction," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 101, no. 3, pp. 359–363, 1993.
- [65] K. M. Kim, D. K. Kirn, Y. M. Park, C. K. Kim, and D. S. Na, "Annexin-I inhibits phospholipase A2 by specific interaction, not by substrate depletion," *FEBS Lett.*, vol. 343, no. 3, pp. 251–255, 1994.
- [66] C. De Coupade, R. Gillet, M. Bennoun, P. Briand, F. Russo-Marie, and E. Solito, "Annexin 1 expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin III SV40 T large antigen transgenic mice," *Hepatology*, vol. 31, no. 2, pp. 371–380, 2000.
- [67] A. Walther, K. Riehemann, and V. Gerke, "A novel ligand of the formyl peptide receptor: Annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with FPR," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 831–840, 2000.
- [68] J. Demaret, "Altérations des polynucléaires neutrophiles au cours des états septiques sévères," *Claude Bernard Lyon 1*, 2016.
- [69] M. Perretti, J. D. Croxtall, S. K. Wheller, N. J. Goulding, R. Hannon, and R. L. Flower, "Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration," *Nat. Med.*, vol. 2, no. 11, pp. 1259–62, 1996.
- [70] M. H. Sheikh and E. Solito, "Annexin A1: Uncovering the many talents of an old protein," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 4, pp. 1–20, 2018.
- [71] L. Vong, F. D'Acquisto, M. Pederzoli-Ribeil, L. Lavagno, R. J. Flower, V. Witko-Sarsat, and M. Perretti, "Annexin 1 cleavage in activated neutrophils: A pivotal role for proteinase 3," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 41, pp. 29998–30004, 2007.
- [72] M. Pederzoli-Ribeil, F. Maione, D. Cooper, A. Al-Kashi, J. Dalli, M. Perretti, and F. D'Acquisto, "Design and characterization of a cleavage-resistant Annexin A1 mutant to control inflammation in the microvasculature," *Blood*, vol. 116, no. 20, pp. 4288–4296, 2010.
- [73] S. L. Williams, I. R. Milne, C. J. Bagley, J. R. Gamble, M. A. Vadas, S. M. Pitson, and Y. Khew-Goodall, "A Proinflammatory Role for Proteolytically Cleaved Annexin A1 in Neutrophil Transendothelial Migration," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 5, pp. 3057–3063, 2010.
- [74] R. P. G. Hayhoe, A. M. Kamal, E. Solito, R. J. Flower, D. Cooper, and M. Perretti, "Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: Indication of distinct receptor involvement," *Blood*, vol. 107, no. 5, pp. 2123–2130, 2006.
- [75] E. Solito, A. Kamal, F. Russo-Marie, J. C. Buckingham, S. Marullo, and M. Perretti, "A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils," *FASEB J.*, vol. 17, no. 11, pp. 1544–1546, 2003.
- [76] R. D. Ye, F. Boulay, J. Wang, and C. Dahlgren, "Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family," *Pharmacol. Rev.*, vol. 61, no. 2, pp. 119–161, 2009.
- [77] S. Ernst, C. Lange, A. Wilbers, V. Goebeler, V. Gerke, and U. Rescher, "An Annexin 1 N-Terminal Peptide Activates Leukocytes by Triggering Different Members of the Formyl Peptide Receptor Family," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 12, pp. 7669–7676, 2004.
- [78] K. Chen, Z. Bao, W. Gong, P. Tang, T. Yoshimura, and J. M. Wang, "Regulation of inflammation by members of the formyl-peptide receptor family," *J. Autoimmun.*, vol. 85, pp. 64–77, 2017.
- [79] M. A. Sugimoto, J. P. Vago, M. M. Teixeira, and L. P. Sousa, "Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance," *J. Immunol. Res.*, vol. 2016, 2016.

- [80] M. Perretti, S. J. Getting, E. Solito, P. M. Murphy, and J.-L. Gao, "Involvement of the Receptor for Formylated Peptides in the in vivo Anti-migratory actions of Annexin 1 and its mimetics," *Am. J. Pathol.*, vol. 158, no. 6, pp. 1969–1973, 2001.
- [81] F. N. E. Gavins, S. Yona, A. M. Kamal, R. J. Flower, and M. Perretti, "Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1 : ALXR- and FPR- related anti-inflammatory mechanisms," *Blood*, vol. 101, no. 10, pp. 4140–4147, 2003.
- [82] J. P. Vago, C. R. C. Nogueira, L. P. Tavares, F. M. Soriani, F. Lopes, R. C. Russo, V. Pinho, M. M. Teixeira, and L. P. Sousa, "Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 92, no. 2, pp. 249–258, 2012.
- [83] M. Scannell, M. B. Flanagan, A. deStefani, K. J. Wynne, G. Cagney, C. Godson, and P. Maderna, "Annexin-1 and Peptide Derivatives Are Released by Apoptotic Cells and Stimulate Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Macrophages," *J. Immunol.*, vol. 178, no. 7, pp. 4595–4605, 2007.
- [84] S. Yona, S. E. M. Heinsbroek, L. Peiser, S. Gordon, M. Perretti, and R. J. Flower, "Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 148, no. 4, pp. 469–477, 2006.
- [85] M. G. Machado, L. P. Tavares, G. V. S. Souza, C. M. Queiroz-Junior, F. R. Ascensão, M. E. Lopes, C. C. Garcia, G. B. Menezes, M. Perretti, R. C. Russo, M. M. Teixeira, and L. P. Sousa, "The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia," *FASEB J.*, vol. 34, no. 2, pp. 2749–2764, 2020.
- [86] K. E. Blume, S. Soeroes, M. Waibel, H. Keppeler, S. Wesselborg, M. Herrmann, K. Schulze-Osthoff, and K. Lauber, "Cell Surface Externalization of Annexin A1 as a Failsafe Mechanism Preventing Inflammatory Responses during Secondary Necrosis," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 12, pp. 8138–8147, 2009.
- [87] Y. H. Yang, D. Aeberli, A. Dacumos, J. R. Xue, and E. F. Morand, "Annexin-1 Regulates Macrophage IL-6 and TNF via Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 2, pp. 1435–1445, 2009.
- [88] L. C. Alldridge, H. J. Harris, R. Plevin, R. Hannon, and C. E. Bryant, "The annexin protein lipocortin 1 regulates the MAPK/ERK pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 53, pp. 37620–37628, 1999.
- [89] S. J. Getting, R. J. Flower, and M. Perretti, "Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 120, no. 6, pp. 1075–1082, 1997.
- [90] A. M. Kamal, R. J. Flower, and M. Perretti, "An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 100, no. SUPPL. 1, pp. 39–48, 2005.
- [91] C. Lange, D. J. Starrett, J. Goetsch, V. Gerke, and U. Rescher, "Transcriptional profiling of human monocytes reveals complex changes in the expression pattern of inflammation-related genes in response to the annexin A1-derived peptide Ac1-25," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 82, no. 6, pp. 1592–1604, 2007.
- [92] I. Galvão, R. V. H. de Carvalho, J. P. Vago, A. L. N. Silva, T. G. Carvalho, M. M. Antunes, F. M. Ribeiro, G. B. Menezes, D. S. Zamboni, L. P. Sousa, and M. M. Teixeira, "The role of annexin A1 in the modulation of the NLRP3 inflammasome," *Immunology*, pp. 0–3, 2020.
- [93] H. Weyd, L. Abeler-Dörner, B. Linke, A. Mahr, V. Jahndel, S. Pfrang, M. Schnölzer, C. S. Falk, and P. H. Kramer, "Annexin A1 on the Surface of Early Apoptotic Cells Suppresses CD8+ T Cell

Immunity," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013.

- [94] E. Vacchelli, Y. Ma, E. E. Baracco, A. Sistigu, D. P. Enot, F. Pietrocola, H. Yang, S. Adjemian, K. Chaba, M. Semeraro, M. Signore, A. De Ninno, V. Lucarini, F. Peschiaroli, L. Businaro, A. Gerardino, G. Manic, T. Ulas, P. Günther, J. L. Schultze, O. Kepp, G. Stoll, C. Lefebvre, C. Mulo, F. Castoldi, S. Rusakiewicz, S. Ladoire, L. Apetoh, J. M. B.-S. Pedro, M. Lucattelli, C. Delarasse, V. Boige, M. Ducreux, S. Delaloge, C. Borg, F. André, G. Schiavoni, I. Vitale, P. Laurent-Puig, F. Mattei, L. Zitvogel, and G. Kroemer, "Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1," *Science (80-.)*, vol. 350, no. 6263, pp. 972–978, 2015.
- [95] B. Zhao, J. Wang, L. Liu, X. Li, S. Liu, Q. Xia, and J. Shi, "Annexin A1 translocates to nucleus and promotes the expression of pro-inflammatory cytokines in a PKC-dependent manner after OGD/R," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. February, pp. 1–13, 2016.
- [96] Z. Luo, H. Wang, S. Fang, L. Li, X. Li, J. Shi, M. Zhu, Z. Tan, and Z. Lu, "Annexin-1 Mimetic Peptide Ac2-26 Suppresses Inflammatory Mediators in LPS-Induced Astrocytes and Ameliorates Pain Hypersensitivity in a Rat Model of Inflammatory Pain," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 40, no. 4, pp. 569–585, 2020.
- [97] F. D'Acquisto, A. Merghani, E. Lecona, G. Rosignoli, C. D. Buckley, R. J. Flower, and M. Perretti, "Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation," vol. 109, no. 3, pp. 1095–1102, 2007.
- [98] F. D'Acquisto, N. Paschalidis, A. L. F. Sampaio, A. Merghani, R. J. Flower, and M. Perretti, "Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 11, pp. 3131–3142, 2007.
- [99] N. Mihaylova, P. Chipinski, S. Bradyanova, T. Velikova, E. Ivanova-Todorova, S. Chausheva, M. Herbáth, D. Kalinova, J. Prechl, D. Kyurkchiev, and A. I. Tchorbanov, *Suppression of autoreactive T and B lymphocytes by anti-annexin A1 antibody in a humanized NSG murine model of systemic lupus erythematosus*, vol. 199, no. 3. 2020.
- [100] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [101] X. F. Bai, X. G. Ni, P. Zhao, S. M. Liu, H. X. Wang, B. Guo, L. P. Zhou, F. Liu, J. S. Zhang, K. Wang, Y. Q. Xie, Y. F. Shao, and X. H. Zhao, "Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance," *World J. Gastroenterol.*, vol. 10, no. 10, pp. 1466–1470, 2004.
- [102] Y. Gu, Q. Feng, H. Liu, Q. Zhou, A. Hu, T. Yamaguchi, S. Xia, and H. Kobayashi, "Bioinformatic evidences and analysis of putative biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinoma," *Heliyon*, vol. 5, no. 8, p. e02378, 2019.
- [103] C. Zhuang, P. Wang, T. Sun, L. Zheng, and L. Ming, "Expression levels and prognostic values of annexins in liver cancer," *Oncol. Lett.*, vol. 18, no. 6, pp. 6657–6669, 2019.
- [104] Y. Lin, G. Lin, W. Fang, H. Zhu, and K. Chu, "Increased expression of annexin A1 predicts poor prognosis in human hepatocellular carcinoma and enhances cell malignant phenotype," *Med. Oncol.*, vol. 31, no. 12, pp. 1–7, 2014.
- [105] T. Masaki, M. Tokuda, M. Ohnishi, S. Watanabe, T. Fujimura, K. Miyamoto, T. Itano, H. Matsui, K. Arima, M. Shirai, T. Maeba, K. Sogawa, R. Konishi, K. Taniguchi, Y. Hatanaka, O. Hatase, and M. Nishioka, "Enhanced expression of the protein kinase substrate annexin I in human hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, vol. 24, no. 1, pp. 72–81, 1996.
- [106] Z. Q. Zhang, X. J. Li, G. T. Liu, Y. Ping, Y. Xia, and H. Wen, "Identification of Annexin A1 protein expression in human gastric adenocarcinoma using proteomics and tissue microarray," *World*

J. Gastroenterol., vol. 19, no. 43, pp. 7795–7803, 2013.

- [107] B. Rong, C. Zhao, H. Liu, Z. Ming, X. Cai, W. Gao, and S. Yang, “Elevated serum annexin A1 as potential diagnostic marker for lung cancer: A retrospective case-control study,” *Am. J. Transl. Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 558–569, 2014.
- [108] R. Duncan, B. Carpenter, L. C. Main, C. Telfer, and G. I. Murray, “Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 98, no. 2, pp. 426–433, 2008.
- [109] T. Xi and G. Zhang, “Integrated analysis of tumor differentiation genes in pancreatic adenocarcinoma,” *PLoS One*, vol. 13, no. 3, pp. 1–16, 2018.
- [110] G. P. Guerrini, D. Pinelli, F. Di Benedetto, E. Marini, V. Corno, M. Guizzetti, A. Aluffi, M. Zambelli, S. Fagioli, M. G. Lucà, A. Lucianetti, and M. Colledan, “Predictive value of nodule size and differentiation in HCC recurrence after liver transplantation,” *Surg. Oncol.*, vol. 25, no. 4, pp. 419–428, 2016.
- [111] T. Y. Cheng, M. S. Wu, J. T. Lin, M. T. Lin, C. T. Shun, H. Y. Huang, K. T. Hua, and M. L. Kuo, “Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway,” *Cancer*, vol. 118, no. 23, pp. 5757–5767, 2012.
- [112] C.-F. Li, K.-H. Shen, L.-C. Huang, H.-Y. Huang, Y.-H. Wang, and T.-F. Wu, “Annexin-I Overexpression Is Associated With Tumour Progression and Independently Predicts Inferior Disease-Specific and Metastasis-Free Survival in Urinary Bladder Urothelial Carcinoma,” *Pathology*, vol. 42, no. 1, pp. 43–49, 2010.
- [113] M. B. Tadei, M. V. Mayorquim, C. B. de Souza, S. de Souza Costa, L. Possebon, H. R. Souza, M. M. Iyomasa-Pilon, M. R. Geromel, and A. P. Girol, “Expression of the Annexin A1 and its correlation with matrix metalloproteinases and the receptor for formylated peptide-2 in diffuse astrocytic tumors,” *Ann. Diagn. Pathol.*, vol. 37, pp. 62–66, 2018.
- [114] J. F. Zhu, W. Huang, H. M. Yi, T. Xiao, J. Y. Li, J. Feng, H. Yi, S. S. Lu, X. H. Li, R. H. Lu, Q. Y. He, and Z. Q. Xiao, “Annexin A1-suppressed autophagy promotes nasopharyngeal carcinoma cell invasion and metastasis by PI3K/AKT signaling activation,” *Cell Death Dis.*, vol. 9, no. 12, 2018.
- [115] Y. Sato, K. Kumamoto, K. Saito, H. Okayama, S. Hayase, Y. Kofunato, K. Miyamoto, I. Nakamura, S. Ohki, Y. Koyama, and S. Takenoshita, “Up-regulated Annexin A1 expression in gastrointestinal cancer is associated with cancer invasion and lymph node metastasis,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 2, no. 2, pp. 239–243, 2011.
- [116] Y. F. Liu, P. F. Zhang, M. Y. Li, Q. Q. Li, and Z. C. Chen, “Identification of annexin A1 as a proinvasive and prognostic factor for lung adenocarcinoma,” *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 28, no. 5, pp. 413–425, 2011.
- [117] K. L. Wang, T. T. Wu, E. Resetkova, H. Wang, A. M. Correa, W. L. Hofstetter, S. G. Swisher, J. A. Ajani, A. Rashid, S. R. Hamilton, and C. T. Albarracin, “Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: Association with poor outcome,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 15, pp. 4598–4604, 2006.
- [118] G. Han, K. Lu, J. Huang, J. Ye, S. Dai, Y. Ye, and L. Zhang, “Effect of Annexin A1 gene on the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells and its regulatory mechanisms,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 39, no. 2, pp. 357–363, 2017.
- [119] X. Guan, Y. Fang, J. Long, and Y. Zhang, “Annexin 1–nuclear factor- κ B–microRNA-26a regulatory pathway in the metastasis of non-small cell lung cancer,” *Thorac. Cancer*, vol. 10, no. 4, pp. 665–

675, 2019.

- [120] R. Belvedere, V. Bizzarro, G. Forte, F. Dal Piaz, L. Parente, and A. Petrella, "Annexin A1 contributes to pancreatic cancer cell phenotype, behaviour and metastatic potential independently of Formyl Peptide Receptor pathway," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. March, pp. 1–14, 2016.
- [121] R. Belvedere, V. Bizzarro, A. Popolo, F. Dal Piaz, M. Vasaturo, P. Picardi, L. Parente, and A. Petrella, "Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells," *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 1–15, 2014.
- [122] E. Pessolano, R. Belvedere, V. Bizzarro, P. Franco, I. De Marco, A. Porta, A. Tosco, L. Parente, M. Perretti, and A. Petrella, "Annexin A1 may induce pancreatic cancer progression as a key player of extracellular vesicles effects as evidenced in the in vitro MIA PaCa-2 model system," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 12, pp. 1–15, 2018.
- [123] Y. Xiao, C. Ouyang, W. Huang, Y. Tang, W. Fu, and A. Cheng, "Annexin A1 can inhibit the in vitro invasive ability of nasopharyngeal carcinoma cells possibly through Annexin A1/S100A9/Vimentin interaction," *PLoS One*, vol. 12, no. 3, pp. 1–17, 2017.
- [124] S. Álvarez-Teijeiro, S. T. Menéndez, M. Á. Villaronga, E. Pena-Alonso, J. P. Rodrigo, R. O. Morgan, R. Granda-Díaz, C. Salom, M. P. Fernandez, and J. M. García-Pedrero, "Annexin A1 down-regulation in head and neck squamous cell carcinoma is mediated via transcriptional control with direct involvement of miR-196a/b," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [125] L. Zhang, X. Yang, L. P. Zhong, X. J. Zhou, H. Y. Pan, K. J. Wei, J. Li, W. T. Chen, and Z. Y. Zhang, "Decreased expression of Annexin A1 correlates with pathologic differentiation grade in oral squamous cell carcinoma," *J. Oral Pathol. Med.*, vol. 38, no. 4, pp. 362–370, 2009.
- [126] J. M. Garcia Pedrero, M. P. Fernandez, R. O. Morgan, A. Herrero Zapatero, M. V. Gonzalez, C. Suarez Nieto, and J. P. Rodrigo, "Annexin A1 Down-Regulation in Head and Neck Cancer Is Associated with Epithelial Differentiation Status," *Am. J. Pathol.*, vol. 164, no. 1, pp. 73–79, 2004.
- [127] N. Hu, M. J. Flaig, H. Su, J. Z. Shou, M. J. Roth, W. J. Li, C. Wang, A. M. Goldstein, G. Li, M. R. Emmert-Buck, and P. R. Taylor, "Comprehensive characterization of annexin I alterations in esophageal squamous cell carcinoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 18 I, pp. 6013–6022, 2004.
- [128] C. P. Paweletz, D. K. Ornstein, M. J. Roth, V. E. Bichsel, J. W. Gillespie, V. S. Calvert, C. D. Vocke, S. M. Hewitt, P. H. Duray, J. Herring, Q. H. Wang, N. Hu, W. M. Linehan, P. R. Taylor, L. A. Liotta, M. R. Emmert-Buck, and E. F. Petricoin, "Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 22, pp. 6293–6297, 2000.
- [129] K. T. Patton, H. M. Chen, L. Joseph, and X. J. Yang, "Decreased annexin I expression in prostatic adenocarcinoma and in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia," *Histopathology*, vol. 47, no. 6, pp. 597–601, 2005.
- [130] G. Yu, J. Wang, Y. Chen, X. Wang, J. Pan, Q. Li, and K. Xie, "Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 25, no. 7, pp. 695–702, 2008.
- [131] G. Yang, Q. Chen, J. Xiao, H. Zhang, Z. Wang, and X. Lin, "Identification of genes and analysis of prognostic values in nonsmoking females with non-small cell lung carcinoma by bioinformatics analyses," *Cancer Manag. Res.*, vol. 10, pp. 4287–4295, 2018.
- [132] L. D. Wang, Y. H. Yang, Y. Liu, H. T. Song, L. Y. Zhang, and P. L. Li, "Decreased expression of

- annexin A1 during the progression of cervical neoplasia," *J. Int. Med. Res.*, vol. 36, no. 4, pp. 665–672, 2008.
- [133] A. Petrella, M. Festa, S. F. Ercolino, M. Zerilli, G. Stassi, E. Solito, and L. Parente, "Annexin-1 downregulation in thyroid cancer correlates to the degree of tumor differentiation," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 5, no. 6, pp. 643–647, 2006.
- [134] Y. Gao, Y. Chen, D. Xu, J. Wang, and G. Yu, "Differential expression of ANXA1 in benign human gastrointestinal tissues and cancers," *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 1–12, 2014.
- [135] A. Jögi, M. Vaapil, M. Johansson, and S. Pählman, "Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors," *Ups. J. Med. Sci.*, vol. 117, no. 2, pp. 217–224, 2012.
- [136] C. Hu, J. Peng, L. Lv, X. Wang, Y. Zhou, J. Huo, and D. Liu, "MiR-196a regulates the proliferation, invasion and migration of esophageal squamous carcinoma cells by targeting ANXA1," *Oncol. Lett.*, vol. 17, no. 6, pp. 5201–5209, 2019.
- [137] Y. M. Wan, J. Tian, L. Qi, L. M. Liu, and N. Xu, "ANXA1 affects cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma," *Exp. Ther. Med.*, vol. 14, no. 5, pp. 5214–5218, 2017.
- [138] V. Bizzarro, R. Belvedere, V. Migliaro, E. Romano, L. Parente, and A. Petrella, "Hypoxia regulates ANXA1 expression to support prostate cancer cell invasion and aggressiveness," *Cell Adhes. Migr.*, vol. 11, no. 3, pp. 247–260, 2017.
- [139] Y. Tu, C. N. Johnstone, and A. G. Stewart, "Annexin A1 influences in breast cancer: Controversies on contributions to tumour, host and immunoediting processes," *Pharmacol. Res.*, vol. 119, pp. 278–288, 2017.
- [140] Observation mondiale du cancer (GCO), "Cancer today." [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/>. [Accessed: 20-May-2020].
- [141] G. Cserni, "Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time," *Pathologica*, vol. 112, no. 1, pp. 25–41, 2020.
- [142] M. Boissierie-Lacroix, G. Hurtevent-Labrot, S. Ferron, N. Lippa, H. Bonnefoi, and G. Mac Grogan, "Correlation between imaging and molecular classification of breast cancers," *Diagn. Interv. Imaging*, vol. 94, no. 11, pp. 1069–1080, 2013.
- [143] C. M. Perou, T. Sørile, M. B. Eisen, M. Van De Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Renshaw, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, Ø. Fluge, A. Pergammenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lønning, A. L. Børresen-Dale, P. O. Brown, and D. Botstein, "Molecular portraits of human breast tumours," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–752, 2000.
- [144] T. Sorlie, C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, G. Stange, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. Van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, P. E. Lønning, and A.-L. Børresen-Dale, "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 19, pp. 10869–10874, 2001.
- [145] A. Goncalves, R. Sabatier, C.-J. Emmanuelle, M. Gilibert, M. Provansal, C. Tarpin, J.-M. Extra, P. Viens, and F. Bertucci, "Synthèse Cancer du sein triple-négatif : caractéristiques histocliniques et moléculaires, prise en charge et perspectives thérapeutiques Triple-negative breast cancer : histoclinical and molecular," *Bull. Cancer*, vol. 100, no. 5, pp. 453–464, 2013.
- [146] H. Yao, G. He, S. Yan, C. Chen, L. Song, T. J. Rosol, and X. Deng, "Triple-negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon?," *Oncotarget*, vol. 8, no. 1, pp. 1913–1924, 2017.

- [147] J. M. Lebert, R. Lester, E. Powell, M. Seal, and J. McCarthy, "Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer," *Curr. Oncol.*, vol. 25, no. June, pp. S142–S150, 2018.
- [148] J. L. da Silva, N. C. Cardoso Nunes, P. Izetti, G. G. de Mesquita, and A. C. de Melo, "Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 145, no. December 2019, p. 102855, 2020.
- [149] B. D. Lehmann, J. A. Bauer, X. Chen, M. E. Sanders, A. Bapsi Chakravarthy, Y. Shyr, and J. A. Pietenpol, "Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies," *New Sci.*, vol. 121, no. 7, pp. 2750–2767, 2011.
- [150] A. R. T. Bergin and S. Loi, "Triple-negative breast cancer: Recent treatment advances [version 1; peer review: 2 approved]," *F1000Research*, vol. 8, pp. 1–11, 2019.
- [151] E. M. Yousef, D. Laperrière, M. Ramzan-Tahir, S. Mader, and L. A. Gaboury, "Deregulated Expression of ANXA1 in Human High-Grade Breast Cancers," *J. Mol. Biomark. Diagn.*, vol. 4, no. 3, pp. 1–10, 2013.
- [152] C. K. Yom, W. Han, S. W. Kim, H. S. Kim, H. C. Shin, J. N. Chang, M. Koo, D. Y. Noh, and B. I. Moon, "Clinical significance of annexin A1 expression in breast cancer," *J Breast Cancer*, vol. 14, no. 4, pp. 262–268, 2011.
- [153] Y. Cao, Y. Li, M. Edelweiss, B. Arun, D. Rosen, E. Resetkova, Y. Wu, J. Liu, A. Sahin, and C. T. Albarracin, "Loss of annexin A1 expression in breast cancer progression," *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, vol. 16, no. 6, pp. 530–534, 2008.
- [154] D. Shen, F. Nooraie, Y. Elshimali, V. Lonsberry, J. He, S. Bose, D. Chia, D. Seligson, H. R. Chang, and L. Goodglick, "Decreased expression of annexin A1 is correlated with breast cancer development and progression as determined by a tissue microarray analysis," *Hum. Pathol.*, vol. 37, no. 12, pp. 1583–1591, 2006.
- [155] S. H. Ahn, H. Sawada, J. Y. Ro, and G. L. Nicolson, "Differential expression of annexin I in human mammary ductal epithelial cells in normal and benign and malignant breast tissues," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 15, no. 2, pp. 151–156, 1997.
- [156] D. Shen, H. R. Chang, Z. Chen, J. He, V. Lonsberry, Y. Elshimali, D. Chia, D. Seligson, L. Goodglick, S. F. Nelson, and J. A. Gornbein, "Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high-throughput analyses," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 326, no. 1, pp. 218–227, 2004.
- [157] S. Maschler, C. A. Gebeshuber, E. M. Wiedemann, M. Alacakaptan, M. Schreiber, I. Custic, and H. Beug, "Annexin A1 attenuates EMT and metastatic potential in breast cancer," *EMBO Mol. Med.*, vol. 2, no. 10, pp. 401–414, 2010.
- [158] L. Tang, Y. Chen, H. Chen, P. Jiang, L. Yan, D. Mo, X. Tang, and F. Yan, "DCST1-AS1 Promotes TGF- β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition and Enhances Chemoresistance in Triple-Negative Breast Cancer Cells via ANXA1," *Front. Oncol.*, vol. 10, no. March, pp. 1–14, 2020.
- [159] M. Okano, M. Oshi, A. L. Butash, E. Katsuta, K. Tachibana, K. Saito, H. Okayama, X. Peng, L. Yan, K. Kono, T. Ohtake, and K. Takabe, "Triple-negative breast cancer with high levels of annexin a1 expression is associated with mast cell infiltration, inflammation, and angiogenesis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 17, pp. 1–11, 2019.
- [160] M. Privat, J. Rudewicz, N. Sonnier, C. Tamisier, F. Ponelle-Chachuat, and Y.-J. Bignon, "Antioxydation And Cell Migration Genes Are Identified as Potential Therapeutic Targets in Basal-Like and BRCA1 Mutated Breast Cancer Cell Lines," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 46–58, 2018.

- [161] A. Bhardwaj, N. Ganesan, K. Tachibana, K. Rajapakshe, C. T. Albarracin, P. H. Gunaratne, C. Coarfa, and I. Bedrosian, "Annexin A1 preferentially predicts poor prognosis of basal-like breast cancer patients by activating mTOR-S6 signaling," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, pp. 1–19, 2015.
- [162] M. Sobral-Leite, J. Wesseling, V. T. H. B. M. Smit, H. Nevanlinna, M. H. van Miltenburg, J. Sanders, I. Hofland, F. M. Blows, P. Coulson, G. Patrycja, J. H. M. Schellens, R. Fagerholm, P. Heikkilä, K. Aittomäki, C. Blomqvist, E. Provenzano, H. R. Ali, J. Figueroa, M. Sherman, J. Lissowska, A. Mannermaa, V. Kataja, V. M. Kosma, J. M. Hartikainen, K. A. Phillips, F. J. Couch, J. E. Olson, C. Vachon, D. Visscher, H. Brenner, K. Butterbach, V. Arndt, B. Holleczeck, M. J. Hooning, A. Hollestelle, J. W. M. Martens, C. H. M. van Deurzen, B. van de Water, A. Broeks, J. Chang-Claude, G. Chenevix-Trench, D. F. Easton, P. D. P. Pharoah, M. García-Closas, M. de Graauw, and M. K. Schmidt, "Annexin A1 expression in a pooled breast cancer series: Association with tumor subtypes and prognosis," *BMC Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [163] L. D. Gibbs and J. K. Vishwanatha, "Prognostic impact of AnxA1 and AnxA2 gene expression in triple-negative breast cancer," *Oncotarget*, vol. 9, no. 2, pp. 2697–2704, 2018.
- [164] A. Alli-Shaik, S. Wee, L. H. K. Lim, and J. Gunaratne, "Phosphoproteomics reveals network rewiring to a pro-adhesion state in annexin-1-deficient mammary epithelial cells," *Breast Cancer Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–15, 2017.
- [165] H. L. F. Swa, W. P. Blackstock, L. H. K. Lim, and J. Gunaratne, "Quantitative proteomics profiling of murine mammary gland cells unravels impact of annexin-1 on DNA damage response, cell adhesion, and migration," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 11, no. 8, pp. 381–393, 2012.
- [166] Y. Yuan, D. Anbalagan, L. H. Lee, R. P. Samy, M. K. Shanmugam, A. P. Kumar, G. Sethi, P. E. Lobie, and L. H. K. Lim, "ANXA1 inhibits miRNA-196a in a negative feedback loop through NF- κ B and C-Myc to reduce breast cancer proliferation," *Oncotarget*, vol. 7, no. 19, pp. 27007–27020, 2016.
- [167] P. Bist, Q. H. Phua, S. Shu, Y. Yi, D. Anbalagan, L. H. Lee, G. Sethi, B. C. Low, and L. H. K. Lim, "Annexin-A1 controls an ERK-RhoA-NF κ B activation loop in breast cancer cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 461, no. 1, pp. 47–53, 2015.
- [168] T. Khau, S. Y. Langenbach, M. Schuliga, T. Harris, C. N. Johnstone, R. L. Anderson, and A. G. Stewart, "Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2," *FASEB J.*, vol. 25, no. 2, pp. 483–496, 2011.
- [169] L. Vecchi, M. Alves Pereira Zóia, T. Goss Santos, A. de Oliveira Beserra, C. M. Colaço Ramos, B. França Matias Colombo, Y. C. Paiva Maia, V. Piana de Andrade, S. Teixeira Soares Mota, T. Gonçalves de Araújo, F. Van Petten de Vasconcelos Azevedo, F. A. Soares, S. M. Oliani, and L. R. Goulart, "Inhibition of the AnxA1/FPR1 autocrine axis reduces MDA-MB-231 breast cancer cell growth and aggressiveness in vitro and in vivo," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1865, no. 9, pp. 1368–1382, 2018.
- [170] M. A. P. Zóia, F. V. P. Azevedo, L. Vecchi, S. T. S. Mota, V. de R. Rodovalho, A. O. Cordeiro, L. I. V. Correia, A. C. A. Silva, V. de M. R. Ávila, T. G. de Araújo, and L. R. Goulart, "Inhibition of triple-negative breast cancer cell aggressiveness by cathepsin D blockage: Role of annexin A1," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 6, 2019.
- [171] H. Kang, J. Ko, and S.-W. Jang, "The role of annexin A1 in expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 423, no. 1, pp. 188–194, 2012.
- [172] M. Okano, K. Kumamoto, M. Saito, H. Onozawa, K. Saito, N. Abe, T. Ohtake, and S. Takenoshita, "Upregulated Annexin A1 promotes cellular invasion in triple-negative breast cancer," *Oncol.*

Rep., vol. 33, no. 3, pp. 1064–1070, 2015.

- [173] H. L. F. Swa, A. A. Shaik, L. H. K. Lim, and J. Gunaratne, “Mass spectrometry based quantitative proteomics and integrative network analysis accentuates modulating roles of annexin-1 in mammary tumorigenesis,” *Proteomics*, vol. 15, no. 2–3, pp. 408–418, 2015.
- [174] P. Bist, S. C. Leow, Q. H. Phua, S. Shu, Q. Zhuang, W. T. Loh, T. H. Nguyen, J. B. Zhou, S. C. Hooi, and L. H. K. Lim, “Annexin-1 interacts with NEMO and RIP1 to constitutively activate IKK complex and NF- κ B: Implication in breast cancer metastasis,” *Oncogene*, vol. 30, no. 28, pp. 3174–3185, 2011.
- [175] M. de Graauw, M. H. van Miltenburg, M. K. Schmidt, C. Pont, R. Lalai, J. Kartopawiro, E. Pardali, S. E. Le Devedec, V. T. Smit, A. van der Wal, L. J. Van’t Veer, A.-M. Cleton-Jansen, P. ten Dijke, and B. van de Water, “Annexin A1 regulates TGF- β signaling and promotes metastasis formation of basal-like breast cancer cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 14, pp. 6340–6345, 2010.
- [176] K. T. Yeung and J. Yang, “Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis,” *Mol. Oncol.*, vol. 11, no. 1, pp. 28–39, 2017.
- [177] E. D. Williams, D. Gao, A. Redfern, and E. W. Thompson, “Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 19, no. 12, pp. 716–732, 2019.
- [178] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, “Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 178–196, 2014.
- [179] Y. Hao, D. Baker, and P. Ten Dijke, “TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 11, 2019.
- [180] Institut National du Cancer (INCa), “Mélanome de la peau.” [Online]. Available: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Melanome-de-la-peau/Points-cles>. [Accessed: 27-May-2020].
- [181] D. Burns, J. George, D. Aucoin, J. Bower, S. Burrell, R. Gilbert, and N. Bower, “The Pathogenesis and Clinical Management of Cutaneous Melanoma: An Evidence-Based Review,” *J. Med. Imaging Radiat. Sci.*, vol. 50, no. 3, p. 460–469.e1, 2019.
- [182] V. Qendro, D. H. Lundgren, K. Rezaul, F. Mahony, N. Ferrell, A. Bi, A. Latifi, D. Chowdhury, S. Gygi, W. Haas, L. Wilson, M. Murphy, and D. K. Han, “Large-scale proteomic characterization of melanoma expressed proteins reveals nestin and vimentin as biomarkers that can potentially distinguish melanoma subtypes,” *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 11, pp. 5031–5040, 2014.
- [183] Institut National du Cancer (INCa), “Épidémiologie des cancers cutanés.” [Online]. Available: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Detection-precoce-des-cancers-de-la-peau/Epidemiologie>. [Accessed: 27-May-2020].
- [184] Société canadienne de cancérologie, “Mélanome.” [Online]. Available: <https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/skin-melanoma/melanoma/?region=ns>. [Accessed: 27-May-2020].
- [185] Fondation pour le mélanome, “Types de mélanomes.” [Online]. Available: <https://www.aimatmelanoma.org/about-melanoma/types-of-melanoma/>. [Accessed: 27-May-2020].
- [186] N. BASSET-SEGUIN and M. BEYLOT-BARRY, “Les mélanomes Cancers de la peau,” 2020. [Online]. Available: <https://dermato-info.fr/fr/la-peau-des-seniors/les-melanomes>. [Accessed: 03-Jun-2020].

- [187] L. Bomar, A. Senithilnathan, and C. Ahn, "Systemic Therapies for Advanced Melanoma," *Dermatol. Clin.*, vol. 37, no. 4, pp. 409–423, 2019.
- [188] P. Fei and W. S. El-Deiry, "P53 and radiation responses," *Oncogene*, vol. 22, no. 37 REV. ISS. 3, pp. 5774–5783, 2003.
- [189] A. G. Jochemsen, "Reactivation of p53 as therapeutic intervention for malignant melanoma," *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 26, no. 1, pp. 114–119, 2014.
- [190] E. Dadachova, R. A. Bryan, R. C. Howell, A. D. Schweitzer, P. Aisen, J. D. Nosanchuk, and A. Casadevall, "The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 21, no. 2, pp. 192–199, 2008.
- [191] C. Robert, L. Thomas, I. Bondarenko, S. O'Day, J. Weber, C. Garbe, C. Lebbe, J. F. Baurain, A. Testori, J. J. Grob, N. Davidson, J. Richards, M. Maio, A. Hauschild, W. H. Miller, P. Gascon, M. Lotem, K. Harmankaya, R. Ibrahim, S. Francis, T. T. Chen, R. Humphrey, A. Hoos, and J. D. Wolchok, "Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 26, pp. 2517–2526, 2011.
- [192] M. Maio, J. J. Grob, S. Aamdal, I. Bondarenko, C. Robert, L. Thomas, C. Garbe, V. Chiarion-Sileni, A. Testori, T. T. Chen, M. Tschaika, and J. D. Wolchok, "Five-year survival rates for treatment-naive patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial," *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 10, pp. 1191–1196, 2015.
- [193] C. Robert, G. V. Long, B. Brady, C. Dutriaux, M. Maio, L. Mortier, J. C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocha, K. J. Savage, M. M. Hernberg, C. Lebbé, J. Charles, C. Mihalciou, V. Chiarion-Sileni, C. Mauch, F. Cognetti, A. Arance, H. Schmidt, D. Schadendorf, H. Gogas, L. Lundgren-Eriksson, C. Horak, B. Sharkey, I. M. Waxman, V. Atkinson, and P. A. Ascierto, "Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 4, pp. 320–330, 2015.
- [194] C. Robert, A. Ribas, J. Schachter, A. Arance, J. Grob, A. Daud, M. S. Carlino, C. M. Mcneil, M. Lotem, J. M. G. Larkin, P. Lorigan, B. Neyns, C. U. Blank, T. M. Petrella, O. Hamid, S. Su, C. Krepler, N. Ibrahim, and G. V Long, "Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study," vol. 20, no. 9, pp. 1239–1251, 2019.
- [195] S. C. Hall, D. M. Smith, F. R. Masiarz, V. W. Soo, H. M. Tran, L. B. Epstein, and A. L. Burlingame, "Mass spectrometric and Edman sequencing of lipocortin I isolated by two-dimensional SDS/PAGE of human melanoma lysates," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 5, pp. 1927–1931, 1993.
- [196] Z. Boudhraa, F. Rondepierre, L. Ouchchane, R. Kintossou, A. Trzeciakiewicz, F. Franck, J. Kanitakis, B. Labeille, J. Joubert-Zakeyh, B. Bouchon, J. L. Perrot, S. Mansard, J. Papon, P. Dechelotte, J. M. Chezal, E. Miot-Noirault, M. Bonnet, M. D'Incan, and F. Degoul, "Annexin A1 in primary tumors promotes melanoma dissemination," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 31, no. 7, pp. 749–760, 2014.
- [197] E. Caputo, L. Maiorana, V. Vasta, F. M. Pezzino, S. Sunkara, K. Wynne, G. Elia, F. M. Marincola, J. A. McCubrey, M. Libra, S. Travali, and M. Kane, "Characterization of human melanoma cell lines and melanocytes by proteome analysis," *Cell Cycle*, vol. 10, no. 17, pp. 2924–2936, 2011.
- [198] J. Shin, I. S. Song, J. H. Pak, and S. W. Jang, "Upregulation of annexin A1 expression by butyrate in human melanoma cells induces invasion by inhibiting E-cadherin expression," *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 11, pp. 14577–14584, 2016.

- [199] F. Rondepierre, B. Bouchon, J. Papon, M. Bonnet-Duquennoy, R. Kintossou, N. Moins, J. Maublant, J. C. Madelmont, M. D'Incan, and F. Degoul, "Proteomic studies of B16 lines: Involvement of Annexin A1 in melanoma dissemination," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1794, no. 1, pp. 61–69, 2009.
- [200] N. Chakravarti, V. G. R. Peddareddigari, C. L. Warneke, M. M. Johnson, W. W. Overwijk, P. Hwu, and V. G. Prieto, "Differential expression of the G-protein-coupled formyl peptide receptor in melanoma associates with aggressive phenotype," *Am. J. Dermatopathol.*, vol. 35, no. 2, pp. 184–190, 2013.
- [201] P. Romero, Z. Boudhraa, M. Carton, A. Hassan, J. Joubert-Zakeyh, B. Pereira, P. Dechelotte, J. Rouanet, and F. Degoul, "Aberrant localisation of Annexin A1 is associated with metastatic outcome in thin melanomas," *Australas. J. Dermatol.*, 2019.
- [202] Z. Boudhraa, C. Merle, D. Mazzocut, J. M. Chezal, C. Chambon, E. Miot-Noirault, M. Theisen, B. Bouchon, and F. Degoul, "Characterization of pro-invasive mechanisms and N-terminal cleavage of ANXA1 in melanoma," *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 306, no. 10, pp. 903–914, 2014.
- [203] D. Xiao, J. Ohlendorf, Y. Chen, D. D. Taylor, S. N. Rai, S. Waigel, W. Zacharias, H. Hao, and K. M. McMasters, "Identifying mRNA, MicroRNA and Protein Profiles of Melanoma Exosomes," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, 2012.
- [204] J. S. Di Martino, C. Mondal, and J. J. Bravo-Cordero, "Textures of the tumour microenvironment," *Essays Biochem.*, vol. 63, no. 5, pp. 619–629, 2019.
- [205] A. El-Kenawi, K. Hänggi, and B. Ruffell, "The immune microenvironment and cancer metastasis," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 10, no. 4, pp. 1–24, 2020.
- [206] P. Ehrlich, "Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung," *Ned. Tijdschr. Geneeskd.*, vol. 5, pp. 273–290, 1909.
- [207] D. Ribatti, "The concept of immune surveillance against tumors. The first theories," *Oncotarget*, vol. 8, no. 4, pp. 7175–7180, 2017.
- [208] M. Burnet, "Cancer-A Biological Approach," *Br. Med. J.*, vol. 1, no. 841, p. 847, 1957.
- [209] L. Thomas, "Discussion of cellular and humoral aspects of hypersensitive states," *Lawrence HS ed, New York, Hoeber- Harper*, 1959.
- [210] M. Burnet, "The Concept of Immunological Surveillance against Neoplasia," *Progr. exp. Tumor Res.*, vol. 13, pp. 1–27, 1970.
- [211] K. Shimizu, T. Iyoda, M. Okada, S. Yamasaki, and S. I. Fujii, "Immune suppression and reversal of the suppressive tumor microenvironment," *Int. Immunol.*, vol. 30, no. 10, pp. 445–455, 2018.
- [212] F. Ghiringhelli, "Suveillance immune antitumorale et échappement," *Corresp. en Onco-Théranostic*, vol. II, no. 1, pp. 6–10, 2013.
- [213] G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber, "Cancer Immunoediting: From Surveillance to Escape," *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 11, pp. 991–998, 2002.
- [214] G. Ehx and C. Perreault, "Discovery and characterization of actionable tumor antigens," *Genome Med.*, vol. 11, no. 1, p. 29, 2019.
- [215] N. Vigneron, "Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [216] O. J. Finn, "Human tumor antigens yesterday, today, and tomorrow," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 5, no. 5, pp. 347–354, 2017.

- [217] L. Zitvogel, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, F. André, A. Tesniere, and G. Kroemer, "The anticancer immune response : indispensable for therapeutic success ? Find the latest version : Science in medicine The anticancer immune response : indispensable for therapeutic success ?," *Sci. Med.*, vol. 118, no. 6, pp. 1991–2001, 2008.
- [218] C. Shembrey, N. D. Huntington, and F. Hollande, "Impact of tumor and immunological heterogeneity on the anti-cancer immune response," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 9, pp. 1–24, 2019.
- [219] S. E. Nicholson, N. Keating, and G. T. Belz, "Natural killer cells and anti-tumor immunity," vol. 110, no. July 2017, pp. 40–47, 2019.
- [220] S. Paul and G. Lal, "The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy," *Front. Immunol.*, vol. 8, no. SEP, 2017.
- [221] N. R. Maimela, S. Liu, and Y. Zhang, "Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 17, pp. 1–13, 2019.
- [222] J. Stockis, R. Roychoudhuri, and T. Y. F. Halim, "Regulation of regulatory T cells in cancer," *Immunology*, vol. 157, no. 3, pp. 219–231, 2019.
- [223] N. Beyersdorf, T. Kerkau, and T. Hünig, "CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective," *ImmunoTargets Ther.*, p. 111, 2015.
- [224] P. Lecot, M. Sarabi, M. Pereira Abrantes, J. Mussard, L. Koenderman, C. Caux, N. Bendriss-Vermare, and M. C. Michallet, "Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. September, pp. 1–19, 2019.
- [225] L. Wu, S. Saxena, M. Awaji, and R. K. Singh, "Tumor-associated neutrophils in cancer: Going pro," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 4, 2019.
- [226] M. E. Shaul and Z. G. Fridlender, "Tumour-associated neutrophils in patients with cancer," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 10, pp. 601–620, 2019.
- [227] M. R. Galdiero, G. Marone, and A. Mantovani, "Cancer inflammation and cytokines," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, no. 8, 2018.
- [228] L. Erpenbeck and M. P. Schön, "Neutrophil extracellular traps: Protagonists of cancer progression?," *Oncogene*, vol. 36, no. 18, pp. 2483–2490, 2017.
- [229] S. Cicco, G. Cicco, V. Racanelli, and A. Vacca, "Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs): Two Potential Targets for COVID-19 Treatment," *Mediators Inflamm.*, vol. 2020, 2020.
- [230] Y. Chen, Y. Song, W. Du, L. Gong, H. Chang, and Z. Zou, "Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression," *J. Biomed. Sci.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–13, 2019.
- [231] S. R. Nielsen and M. C. Schmid, "Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis," *Mediators Inflamm.*, vol. 2017, 2017.
- [232] S. Wang, R. Liu, Q. Yu, L. Dong, Y. Bi, and G. Liu, "Metabolic reprogramming of macrophages during infections and cancer," *Cancer Lett.*, vol. 452, no. November 2018, pp. 14–22, 2019.
- [233] R. Lugano, M. Ramachandran, and A. Dimberg, "Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 77, no. 9, pp. 1745–1770, 2020.
- [234] R. I. Teleanu, C. Chircov, A. M. Grumezescu, and D. M. Teleanu, "Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment," *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 1, p. 84, 2019.

- [235] N. Nishida, H. Yano, T. Nishida, T. Kamura, and M. Kojiro, "Angiogenesis in cancer," *Vasc. Health Risk Manag.*, vol. 2, no. 3, pp. 213–219, 2006.
- [236] G. Multhoff and P. Vaupel, "Hypoxia compromises anti-cancer immune responses," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1232, pp. 131–143, 2020.
- [237] M. De Palma, D. Biziato, and T. V. Petrova, "Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 8, pp. 457–474, 2017.
- [238] T. Liu, C. Han, S. Wang, P. Fang, Z. Ma, L. Xu, and R. Yin, "Cancer-associated fibroblasts: An emerging target of anti-cancer immunotherapy," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2019.
- [239] J. A. Eble and S. Niland, "The extracellular matrix in tumor progression and metastasis," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 36, no. 3, pp. 171–198, 2019.
- [240] K. Shiga, M. Hara, T. Nagasaki, T. Sato, H. Takahashi, and H. Takeyama, "Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth," *Cancers (Basel)*, vol. 7, no. 4, pp. 2443–2458, 2015.
- [241] L. Monteran and N. Erez, "The dark side of fibroblasts: Cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. AUG, pp. 1–15, 2019.
- [242] E. Henke, R. Nandigama, and S. Ergün, "Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 6, no. January, pp. 1–24, 2020.
- [243] E. Sahai, I. Astsaturon, E. Cukierman, D. G. DeNardo, M. Egeblad, R. M. Evans, D. Fearon, F. R. Greten, S. R. Hingorani, T. Hunter, R. O. Hynes, R. K. Jain, T. Janowitz, C. Jorgensen, A. C. Kimmelman, M. G. Kolonin, R. G. Maki, R. S. Powers, E. Puré, D. C. Ramirez, R. Scherz-Shouval, M. H. Sherman, S. Stewart, T. D. Tlsty, D. A. Tuveson, F. M. Watt, V. Weaver, A. T. Weeraratna, and Z. Werb, "A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 20, no. 3, pp. 174–186, 2020.
- [244] C. Walker, E. Mojares, and A. Del Río Hernández, *Role of extracellular matrix in development and cancer progression*, vol. 19, no. 10. 2018.
- [245] G.-F. Xiong and R. Xu, "Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression," *J. Cancer Metastasis Treat.*, vol. 2, no. 9, p. 357, 2016.
- [246] M. Yi and J. E. Schnitzer, "Impaired tumor growth, metastasis, angiogenesis and wound healing in annexin A1-null mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 42, pp. 17886–17891, 2009.
- [247] L. A. Moraes, S. Kar, S. L. Foo, T. Gu, Y. Q. Toh, P. B. Ampomah, K. Sachaphibulkij, G. Yap, O. Zharkova, H. M. Lukman, A. M. Fairhurst, A. P. Kumar, and L. H. K. Lim, "Annexin-A1 enhances breast cancer growth and migration by promoting alternative macrophage polarization in the tumour microenvironment," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [248] E. Z. F. Ang, H. T. Nguyen, H. L. Sim, T. C. Putti, and L. H. K. Lim, "Annexin-1 regulates growth arrest induced by high levels of estrogen in MCF-7 breast cancer cells," *Mol. Cancer Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 266–274, 2009.
- [249] Y. Li, L. Cai, H. Wang, P. Wu, W. Gu, Y. Chen, H. Hao, K. Tang, P. Yi, M. Liu, S. Miao, and D. Ye, "Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2," *Oncogene*, vol. 30, no. 36, pp. 3887–3899, 2011.
- [250] F. Bai, P. Zhang, Y. Fu, H. Chen, M. Zhang, Q. Huang, D. Li, B. Li, and K. Wu, "Targeting ANXA1 abrogates Treg-mediated immune suppression in triple-negative breast cancer," *J.*

Immunother. Cancer, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, 2020.

- [251] L. Galluzzi, A. Buqué, O. Kepp, L. Zitvogel, and G. Kroemer, “Immunogenic cell death in cancer and infectious disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 17, no. 2, pp. 97–111, 2017.
- [252] A. Serrano-del Valle, A. Anel, J. Naval, and I. Marzo, “Immunogenic cell death and immunotherapy of multiple myeloma,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 7, no. MAR, pp. 1–22, 2019.
- [253] G. Kroemer, L. Galluzzi, O. Kepp, and L. Zitvogel, “Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 31, no. 1, pp. 51–72, 2013.
- [254] F. Radogna and M. Diederich, “Stress-induced cellular responses in immunogenic cell death: Implications for cancer immunotherapy,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 153, no. February, pp. 12–23, 2018.
- [255] D. V. Krysko, A. D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, and P. Vandenabeele, “Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 12, pp. 860–875, 2012.
- [256] E. E. Baracco, A. Petrazzuolo, and G. Kroemer, *Assessment of annexin A1 release during immunogenic cell death*, 1st ed., vol. 629. Elsevier Inc., 2019.
- [257] E. E. Baracco, G. Stoll, P. Van Endert, L. Zitvogel, E. Vacchelli, and G. Kroemer, “Contribution of annexin A1 to anticancer immunosurveillance,” *Oncoimmunology*, vol. 8, no. 11, pp. 1–11, 2019.
- [258] J. Rouanet, V. Benboubker, H. Akil, A. Hennino, P. Auzeloux, S. Besse, B. Pereira, S. Delorme, S. Mansard, M. D’Incan, F. Degoul, and P. O. Rouzairé, “Immune checkpoint inhibitors reverse tolerogenic mechanisms induced by melanoma targeted radionuclide therapy,” *Cancer Immunol. Immunother.*, no. 123456789, 2020.
- [259] P. Oh, Y. Li, J. Yu, E. Durr, K. M. Krasinska, L. A. Carver, J. E. Testa, and J. E. Schnitzer, “Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy,” *Nature*, vol. 429, no. 6992, pp. 629–635, 2004.
- [260] K. L. Allen, J. Cann, W. Zhao, N. Peterson, M. Lazzaro, H. Zhong, H. Wu, W. F. Dall’Acqua, M. Jack Borrok, M. M. Damschroder, P. Tsui, and Q. Li, “Upregulation of annexin A1 protein expression in the intratumoral vasculature of human non–small-cell lung carcinoma and rodent tumor models,” *PLoS One*, vol. 15, no. 6, pp. 1–20, 2020.
- [261] M. Nonaka, M. Suzuki-anekeji, J. Nakayama, H. Mabashi-asazuma, D. L. Jarvis, J. Yeh, K. Yamasaki, T. O. Akama, C.-T. Huang, A. Rosa Campos, M. Nagaoka, T. Sasai, I. Kimura-takagi, Y. Suwa, T. Yaegashi, T. K. Shibata, K. Sugihara, C. Nishizawa-harada, M. Fukuda, and M. N. Fukuda, “Overcoming the blood – brain barrier by Annexin A1-binding peptide to target brain tumours,” *Br. J. Cancer*, no. August, pp. 1–11, 2020.
- [262] A. Pin, F. Houle, P. Fournier, M. Guillonéau, É. R. Paquet, M. J. Simard, I. Royal, and J. Huot, “Annexin-1-mediated Endothelial Cell Migration and Angiogenesis Are Regulated by Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) -induced Inhibition of miR-196a Expression * □,” vol. 287, no. 36, pp. 30541–30551, 2012.
- [263] M. C. Côté, J. R. Lavoie, F. Houle, A. Poirier, S. Rousseau, and J. Huot, “Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM kinase 1-mediated phosphorylation of annexin 1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 11, pp. 8013–8021, 2010.
- [264] J. Z. Lacerda, C. C. Drewes, K. K. O. Mimura, C. de F. Zanon, T. Ansari, C. D. Gil, K. V. Greco, S. H. P. Farsky, and S. M. Oliani, “Annexin A12-26 treatment improves skin heterologous

- transplantation by modulating inflammation and angiogenesis processes," *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. SEP, pp. 1–11, 2018.
- [265] Z. Fu, S. Zhang, B. Wang, W. Huang, L. Zheng, and A. Cheng, "Annexin A1: A double-edged sword as novel cancer biomarker," *Clin. Chim. Acta*, vol. 504, no. October 2019, pp. 36–42, 2020.
- [266] S. L. Foo, G. Yap, J. Cui, and L. H. K. Lim, "Annexin-A1 – A Blessing or a Curse in Cancer?," *Trends Mol. Med.*, vol. 25, no. 4, pp. 315–327, 2019.
- [267] N. Su, X. Y. Xu, H. Chen, W. C. Gao, C. P. Ruan, Q. Wang, and Y. P. Sun, "Increased expression of annexin A1 is correlated with K-ras mutation in colorectal cancer," *Tohoku J. Exp. Med.*, vol. 222, no. 4, pp. 243–250, 2010.
- [268] P. Haridas, J. A. McGovern, S. D. L. McElwain, and M. J. Simpson, "Quantitative comparison of the spreading and invasion of radial growth phase and metastatic melanoma cells in a three-dimensional human skin equivalent model," *PeerJ*, vol. 2017, no. 9, 2017.
- [269] L. Xu, S. S. Shen, Y. Hoshida, A. Subramanian, K. Ross, J. P. Brunet, S. N. Wagner, S. Ramaswamy, J. P. Mesirov, and R. O. Hynes, "Gene expression changes in an animal melanoma model correlate with aggressiveness of human melanoma metastases," *Mol. Cancer Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 760–769, 2008.
- [270] F. D'Acquisto and M. Perretti, "ANNEXIN 1 ANTIBODY," US 9,127,051 B2, 2015.
- [271] R. Li, S. Hu, Y. Chang, Z. Zhang, Z. Zha, H. Huang, G. Shen, J. Liu, L. Song, and W. Wei, "Development and characterization of a humanized anti-HER2 antibody HuA21 with potent anti-tumor properties in breast cancer cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 4, pp. 1–13, 2016.
- [272] F. Vanderhoeven, A. L. Redondo, A. L. Martinez, L. M. Vargas-Roig, A. M. Sanchez, and M. I. Flamini, "Synergistic antitumor activity by combining trastuzumab with retinoic acid in HER2 positive human breast cancer cells," *Oncotarget*, vol. 9, no. 41, pp. 26527–26542, 2018.
- [273] X. F. Le, M. I. Almeida, W. Mao, R. Spizzo, S. Rossi, M. S. Nicoloso, S. Zhang, Y. Wu, G. A. Calin, and R. C. Bast, "Modulation of microRNA-194 and cell migration by her2-targeting trastuzumab in breast cancer," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, pp. 1–14, 2012.
- [274] C. S. Park, T. K. Kim, H. G. Kim, Y. J. Kim, M. H. Jeoung, W. R. Lee, N. K. Go, K. Heo, and S. Lee, "Therapeutic targeting of tetraspanin8 in epithelial ovarian cancer invasion and metastasis," *Oncogene*, vol. 35, no. 34, pp. 4540–4548, 2016.
- [275] M. El Kharbili, M. Cario, N. Béchettille, C. Pain, C. Boucheix, F. Degoul, I. Masse, and O. Berthier-Vergnes, "TSPAN8 drives melanoma dermal invasion by promoting prommp-9 activation and basement membrane proteolysis in a keratinocyte-dependent manner," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 5, 2020.
- [276] D. Anbalagan, G. Yap, Y. Yuan, V. K. Pandey, W. H. Lau, S. Arora, P. Bist, J. S. B. Wong, G. Sethi, P. M. Nissom, P. E. Lobie, L. H. K. Lim, and J. Li, "Annexin-A1 regulates MicroRNA-26b* and MicroRNA-562 to directly target NF-κB and angiogenesis in breast cancer cells," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, pp. 1–20, 2014.
- [277] F. C Dempsey, H. Al-Ali, S. J Crichton, H. C W Hays, C. N Parris, and C. B Wood, "Annexin-A1 : A New Immunomodulation / Checkpoint Pathway in Cancer," 2020.
- [278] E. Cristante, S. McArthur, C. Mauro, E. Maggioli, I. A. Romero, M. Wylezinska-Arridge, P. O. Couraud, J. Lopez-Tremoleda, H. C. Christian, B. B. Weksler, A. Malaspina, and E. Solito, "Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 3, pp.

832–841, 2013.

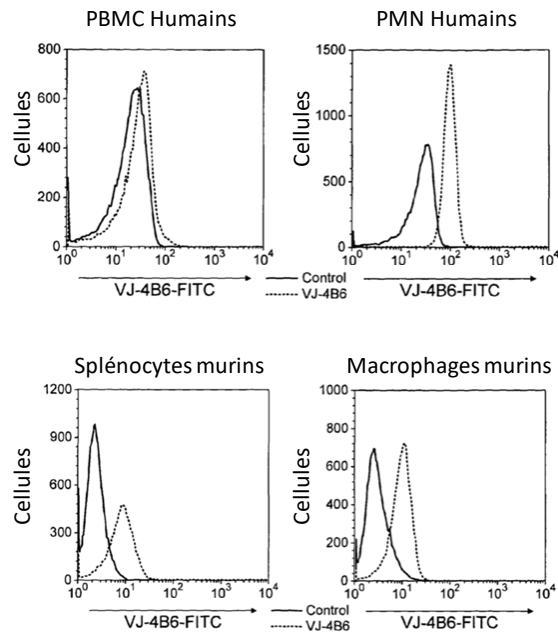
- [279] Centre international de Recherche sur le Cancer and OMS, “Dernières données mondiales sur le cancer : le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018,” *International Agency Res. Cancer*, pp. 8–10, 2018.
- [280] H. Kang, J. Ko, and S. W. Jang, “The role of annexin A1 in expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 423, no. 1, pp. 188–194, 2012.
- [281] L. P. Chapman, M. J. Epton, J. C. Buckingham, J. F. Morris, and H. C. Christian, “Evidence for a role of the adenosine 5'-triphosphate-binding cassette transporter A1 in the externalization of annexin I from pituitary folliculo-stellate cells,” *Endocrinology*, vol. 144, no. 3, pp. 1062–1073, 2003.

ANNEXES

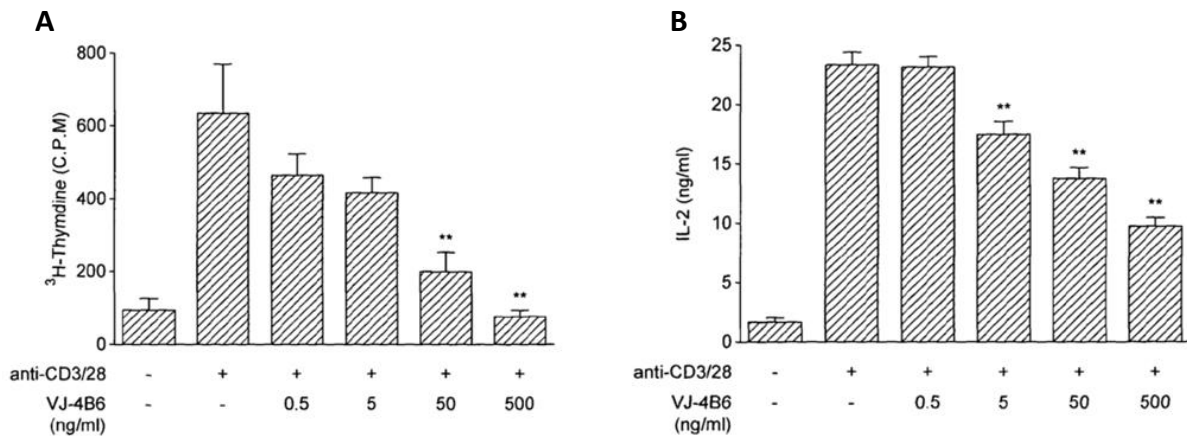
Annexe 1 : Tableau récapitulatif de l'expression de l'ANXA1 dans différents cancers et son implication dans le développement et la progression tumorale. T : tumeur, TS : tissu sain, D : différencié, ND : non/peu différencié. (Hors cancer du sein et mélanome)

| Type de cancer | Données d'expression | | Profil d'expression | | Effet clinico-pathologique | Effet ANXA1 <i>in vitro</i> | | | Effet ANXA1 <i>in vivo</i> | | Source |
|--------------------------------|----------------------|----------|---------------------|---|---|-----------------------------|-----------|----------|----------------------------|------------|--|
| | ARN | Protéine | ↑ | ↓ | | Prolifération | Migration | Invasion | Croissance tumorale | Métastases | |
| Pancréas | gène | | T vs TS | | | | | | | | Gu et al. 2019 |
| | | | | | | | ↑ | ↑ | | | Pessolano et al. 2018, Belvedere et al. 2014 |
| | | | | | | ↓ | ↑ | ↑ | | ↑ | Belvedere et al. 2016 |
| | x | x | T vs TS | | | | | | | | Gao et al., 2014 |
| | | x | T vs TS ND vs D | | | | | | | | |
| Foie | x | | T vs TS | | | | | | | | Zhuang et al. 2019 |
| | | x | T vs TS | | | | ↑ | ↑ | | | Lin et al. 2014 |
| | | x | T vs TS ND vs D | | | | | | | | Masaki et al. 1996 |
| Œsophage (cellules squameuses) | | | | | | ↑ | ↑ | ↑ | | | Han et al. 2016 |
| | | | | | | ↓ | ↓ | ↓ | | | Hu et al. 2019 |
| | x | x | T vs TS ND vs D | | | | | | | | Hu et al. 2004 |
| | x | x | T vs TS ND vs D | | | | | | | | Gao et al., 2014 |
| | | | | ↓ expression associé progression tumorale | | | | | | | Pawelz et al. 2000 |
| Œsophage (adénocarcinome) | | | x | | ↑ rechutes ↓ survie | | | | | | Wang et al. 2006 |
| Estomac | | x | T vs TS | | expression associée ↑ métastases | | | | | | Zang et am. 2013 |
| | | | | | Expression associée haut grade et ↓ survie | | ↑ | ↑ | | ↑ | Cheng et am. 2012 |
| | x | x | T vs TS | | Expression associée ↑ métastases ganglionnaires et ↓ survie | | | | | | Sato et al., 2011 |
| | | x | T vs TS ND vs D | | ↓ Expression associé progression tumorale et ↓ survie | | | | | | Yu et al. 2008 |
| | x | x | T vs TS ND vs D | | | ↓ | ↓ | | | | Gao et al. 2014 |
| Colorectale | x | x | T vs TS | | Corrélation positive expression avec mutation KRAS | | | | | | Su et al. 2010 |
| | | x | T vs TS | | | | | | | | Duncan et al. 2008 |
| Tête et coup | | x | T vs TS ND vs D | | | | | | | | Alvarez-Teijeiro et al. 2017 |
| | | x | T vs TS ND vs D | | | | | | | | Garci Pedrero et al. 2004 |
| Naso-pahryngé | | x | M vs NM | | progression tumorale et ↓ survie | | ↑ | ↑ | | ↑ | Zhu et al. 2018 |
| Oral-squameux | | | | | | | ↓ | ↓ | | | Xiao et al. 2017 |
| | | | | | | | | ↓ | | | Wan et al. 2017 |
| | x | x | T vs TS | | Corrélation négative grade | | | | | | Zhang et al. 2009 |
| Poumon | | | | | | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | | Guan et al. 2018 |
| | x | x | T vs TS | | ↑ sérum associée agressivité | | | | | | Rong et al. 2014 |
| | | x | M vs NM | | ↑ rechutes ↓ survie | | | ↑ | | | Liu et al. 2011 |
| | gene | | | x | ↓ survie | | | | | | Yang et al. 2018 |
| Prostate | | | | | | | | ↑ | | | Bizzarro et al. 2017 |
| | | x | T vs TS | | ↓ expression associée progression tumorale | | | | | | Patton et al. 2005 |
| | x | T vs TS | | | | | | | | | Pawelz et al. 2000 |
| Vessie | | x | x | | expression associée grade élevé et ↓ survie | | | | | | Li et al., 2010 |
| Ovaire | | x | T vs TS | | Survie à 5 ans ↑ | | | | | | Manai et al. 2020 |
| Col de l'utérus | | | | | | ↓ | ↑ | | | | Cardin et al. 2019 |
| | | x | T vs TS ND vs D | | ↓ Expression associé progression tumorale | | | | | | Wang et al. 2008 |
| Glioblastome | | x | x | | Présente tumeur haut grade | | | | | | Tadei et al. 2018 |
| Tyroïde | | x | T vs TS ND vs D | | ↓ expression associée agressivité | | | | | | Petrella et al. 2006 |

Annexe 2 : Évaluation des capacités de reconnaissance du VJ4B6 par cytométrie en flux au niveau de cellules immunitaires humaines et murines. (D'après le brevet du VJ4B6 [270])



Annexe 3 : Inhibition de la prolifération (A) et de l'activation (B) des lymphocytes T murins par le VJ4B6. (D'après le brevet du VJ4B6 [270])



Annexe 4 : Publication parue dans journal « cancer immunology immunotherapy », le 23 mai 2020, « Immune checkpoint inhibitors reverse tolerogenic mechanisms induced by melanoma targeted radionuclide therapy », PMID : 32447411

Jacques Rouanet, Valentin Benboubker, Hussein Akil, Ana Hennino, Philippe Auzeloux, Sophie Besse, Bruno Pereira, Solène Delorme, Sandrine Mansard, Michel D'Incan, Françoise Degoul, Paul-Olivier Rouzair



Immune checkpoint inhibitors reverse tolerogenic mechanisms induced by melanoma targeted radionuclide therapy

Jacques Rouanet^{1,2,3} · Valentin Benboubker^{1,4} · Hussein Akil¹ · Ana Hennino⁵ · Philippe Auzeloux¹ · Sophie Besse¹ · Bruno Pereira⁶ · Solène Delorme¹ · Sandrine Mansard² · Michel D'Incan^{1,2} · Françoise Degoul¹ · Paul-Olivier Rouzairé^{1,4}

Received: 3 February 2020 / Accepted: 12 May 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

In line with the ongoing phase I trial (NCT03784625) dedicated to melanoma targeted radionuclide therapy (TRT), we explore the interplay between immune system and the melanin ligand [¹³¹I]ICF01012 alone or combined with immunotherapy (immune checkpoint inhibitors, ICI) in preclinical models. Here we demonstrate that [¹³¹I]ICF01012 induces immunogenic cell death, characterized by a significant increase in cell surface-exposed annexin A1 and calreticulin. Additionally, [¹³¹I]ICF01012 increases survival in immunocompetent mice, compared to immunocompromised (29 vs. 24 days, $p = 0.0374$). Flow cytometry and RT-qPCR analyses highlight that [¹³¹I]ICF01012 induces adaptive and innate immune cell recruitment in the tumor microenvironment. [¹³¹I]ICF01012 combination with ICIs (anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1) has shown that tolerance is a main immune escape mechanism, whereas exhaustion is not present after TRT. Furthermore, [¹³¹I]ICF01012 and ICI combination has systematically resulted in a prolonged survival ($p < 0.0001$) compared to TRT alone. Specifically, [¹³¹I]ICF01012 + anti-CTLA-4 combination significantly increases survival compared to anti-CTLA-4 alone (41 vs. 26 days; $p = 0.0011$), without toxicity. This work represents the first global characterization of TRT-induced modifications of the antitumor immune response, demonstrating that tolerance is a main immune escape mechanism and that combining TRT and ICI is promising.

Keywords Targeted radionuclide therapy · Metastatic melanoma · Immune checkpoint inhibitor · Tolerance · Melanin · Anti- β ig-h3

Abbreviations

| | |
|-------|---|
| Ab | Antibody |
| DAMPs | Damage-associated molecular pattern molecules |
| EBRT | External beam radiation therapy |
| ICI | Immune checkpoint inhibitors |
| NK | Natural killer |
| TRT | Targeted radionuclide therapy |

Françoise Degoul and Paul-Olivier Rouzairé have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00262-020-02606-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jacques Rouanet
jacques.rouanet@inserm.fr

¹ UMR1240 INSERM, Université Clermont Auvergne, 58, rue Montalembert, BP 184, 63005 Clermont-Ferrand, France

² Department of Dermatology and Oncodermatology, CHU Estaing, 1 place Lucie et Raymond Aubrac, 63000 Clermont-Ferrand, France

³ Centre Jean Perrin, 58, rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand, France

⁴ Department of Histocompatibility and Immunogenetics, CHU Gabriel Montpied, 58 rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France

⁵ UMR INSERM 1052 CNRS 5286 CRCL, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France

⁶ Biostatistics Unit, DRCI, CHU Gabriel Montpied, 58 rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France

Introduction

Cutaneous melanoma is one of the deadliest types of skin cancer, developing from epidermis melanocytes—cells specialized in melanin synthesis. Since 2010, the emergence of new specific treatments has heavily modified metastatic melanoma prognosis, especially MAPK-targeted therapies and immunotherapy. Melanoma is an obvious candidate for immunotherapy due to its high mutational burden [1], leading to a high number of potential neoantigens. However, stimulating immune response is a challenge since melanoma cells develop mechanisms to avoid or annihilate it. These immune escape mechanisms involve (1) decrease in antigen expression, CMH molecules or natural killer (NK) cell co-activator ligands, (2) inhibition of co-stimulatory signals, (3) expression of co-inhibitors, (4) induction of T cell exhaustion and (5) tolerogenic immune response [2]. Classical oncologic treatments (such as external beam radiation therapy, EBRT [3]) can boost these mechanisms. On the other hand, a strategy of immunotherapy consists in reversing these immune escape mechanisms using immune checkpoint inhibitors [4] (i.e., anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies, Abs). CTLA-4 and PD-1 are immune checkpoint receptors that downregulate T cell activation involved in immunologic tolerance. CTLA-4 is expressed by T regulatory cells and upregulated in activated T cells. CTLA-4 is a CD28 homologue that competes with CD28 to interact with B7 ligands to inactivate T cells [5]. PD-1 is expressed by activated T cells, monocytes, B cells and NK cells. PD-1 interaction with its ligands, PD-L1 or PD-L2, inhibits T cell receptor signaling and prevents T cell activation as well as proinflammatory cytokine secretion [6]. PD-1 is the main marker of T cell exhaustion. Therapeutic inhibition of PD-1 and of CTLA-4 in melanoma induces persistent response and long-term survival [4]. Other immune checkpoint inhibitors (ICIs) are currently being tested in clinical trials (for instance, Ab against Lag3) [4]. Another interesting approach consists in depleting β ig-h3, a matrix protein expressed upon TGF- β signaling, with a specific Ab. β ig-h3 is highly expressed in melanoma and associated with bad prognosis and metastatic spread [7]. β ig-h3 via interactions with integrin β 3 inhibits proliferation and activation of CD8⁺ cells and macrophages in tumor microenvironment. Therefore, a β ig-h3-depleting mAb significantly decreased tumor growth by promoting anti-tumor immunity in a murine model of pancreatic ductal adenocarcinoma [8, 9].

The impact of EBRT on the immune response involves both innate and adaptive mechanisms [3], and EBRT has been successfully used in combination with ICIs in both preclinical models [10] and clinical trials [11, 12].

Ionizing radiations enhance antitumor immune response by releasing antigens and inducing neoantigens expression, by increasing expression of co-stimulatory or co-inhibitory molecules or CMH molecules, by recruiting immune cells in the tumor microenvironment such as CD8⁺ T cells and regulatory T cells and by provoking immunogenic death. Immunogenic death [13] is a form of cell death induced by irradiation as well as chemotherapy, which leads to expression of damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) by the tumor cells. These DAMPs are immunostimulatory signals that activate antigen-presenting cells and promote cytotoxic T cell response. DAMP signals consist in the externalization of calreticulin and annexin A1 [14], in the release of HMGB1 and ATP in the extracellular matrix and in the secretion of IFN-1.

Few data are available regarding consequences of targeted radionuclide therapy (TRT) on antitumor immune response. A study has shown that TRT using ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE induces recruitment of CD86-bearing antigen-presenting cells and NK cells in murine neuroendocrine tumor microenvironment [15]. Additionally, the use of ²²⁴Ra wires in different tumor models induces an immune T response [16]. Combination of a ⁹⁰Y radiolabeled anti-CEA mAb with an antitumoral vaccine induces a CD4⁺ and CD8⁺ T-response in a murine carcinoma model [17]. Recently, Hernandez et al. have demonstrated that a ⁹⁰Y radiolabeled alkylphosphocholine (NM600) induces a memory T cell response in a lymphoma syngeneic model [18].

Thus, combining TRT with ICIs might be of major interest since it could increase ICIs efficacy. Recently, Choi et al. have combined ICI with a TRT approach using a ¹⁷⁷Lu-radiolabeled peptidomimetic targeting very late antigen-4 (VLA-4) [19], an integrin highly expressed in melanoma as well as in immune cells. In this preclinical study, TRT combined with dual ICI (anti-CTLA-4 + either anti-PD-1 or anti-PD-L1) has led to a benefit in median survival (22 days and 23 days, respectively) compared to TRT alone (19 days).

Our group has developed [¹³¹I]ICF01012, a radiolabeled melanin ligand for metastatic melanoma TRT [20], which specifically binds to pigmented melanoma [21]. In murine syngeneic [22] and xenograft [23] preclinical models, systemic injection of [¹³¹I]ICF01012 reduces tumor growth and extends survival time, with minimal toxicity [24]. A phase I clinical trial of [¹³¹I]ICF01012 is currently ongoing in order to evaluate its toxicity and assess the appropriate therapeutic dose in human (NCT03784625). Here we study the interaction between immune system and [¹³¹I]ICF01012 TRT using functional and molecular in vitro and in vivo approaches in the murine B16F10 model. We also evaluate the efficacy of combined use of [¹³¹I]ICF01012 with different ICI (anti-CTLA4, anti-PD1 and anti-PDL1) and with an anti- β ig-h3 Ab.

Materials and methods

Cell culture and cell lines

Murine B16F10 melanoma cell line was purchased from the ATCC in 2005 and grown as previously described [25]. Cells were free of mycobacterial contamination tested by PCR (EUROFINS) in 10/2018.

Murine models

Experimentations on mice were in conformity with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (8th edition, 2011) and were approved by local Ethic committee of Clermont-Ferrand (C2E2A no. 002) and French Ministry of Education and Research (Approval No. 12211-2017111613576925). B16F10 cells (2×10^5) were injected subcutaneously in the right flank of 5-week-old female mice. C57BL/6J wild-type mice were purchased at Charles River (L'Arbresle, France), and *Rag2^{KO}* mice were provided by Dr Hennino (INSERM U1052, Lyon, France).

Therapy protocols

[¹³¹I]ICF01012 was prepared according to Chezal et al. [20]. [¹³¹I]ICF01012 monotherapy B16F10(C57BL/6 J) and B16F10(*Rag2^{KO}*) mice were injected intravenously with either 18.5 MBq/100 μ L of [¹³¹I]ICF01012 or with 100 μ L of vehicle ten days after tumor implantation.

Combinations B16F10(C57BL/6 J) mice received four intraperitoneal injections of immunotherapy or corresponding isotope (Supplementary Table 3) days 6, 10, 14 and 18 post-tumor implantation. Anti-PD-1, anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 antibodies were purchased at BioXCell (Lebanon, USA) and used at the dose of 200 μ g per injection. Anti- β ig-h3 antibody was provided by Dr HENNINO and used at the dose of 6 μ g per injection. After the second antibody injection, mice were injected intravenously with [¹³¹I]ICF01012 (18.5 MBq/100 μ L) or vehicle (100 μ L).

Follow-up and survival study

Body weight and tumor volume were measured three times a week until tumor volume reached 1000 mm³ and then daily. Tumor volume was calculated from the measurement of two perpendicular diameters using a caliper according to the formula $L \times S^2/2$, where L and S are the largest and smallest diameters, respectively, expressed in millimeters. Mice were killed when tumor volume reached approximately 2000 mm³ or in case of a weight loss reaching 20% or at experiment

time. Adverse events were monitored daily. Doubling times (DT) have been calculated individually for each animal as previously described [22].

Tumor collection

B16F10(C57BL/6J) mice were killed at day ten post-intravenously injection of [¹³¹I]ICF01012 for immunofluorescence and RT-qPCR analyses and at day 3, day 6 and day 12 post-i.v. injection of [¹³¹I]ICF01012 for flow cytometry analyses. For TLDA analysis, B16F10(C57BL/6 J) mice were harvested when they reached the survival endpoint. Tumors were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for RT-qPCR and TLDA analysis, or fixed in 10% neutral buffered formalin (Sigma) and stored in 70% ethanol for immunofluorescence analysis. Flow cytometry analyses were performed on fresh tumor in RPMI 1640 (Invitrogen).

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed as previously described [25]. The following primary Abs were used: rabbit polyclonal anti-annexin A1 (1/200, ThermoFischer® #71-3400) and recombinant rabbit monoclonal anti-calreticulin (1/500, Abcam ab92516). Isotype controls used irrelevant normal rabbit IgG (Sigma). Slides were then incubated with fluorescence-conjugated secondary Ab to rabbit IgG (1/500; Invitrogen) for 1 h at RT. Nuclei were stained with DAPI (0.1 μ g/mL; Sigma). After slide mounting with Vectashield, emitting fluorescence was detected using SPE confocal microscope (Leica) and analyzed with Fiji software.

Flow cytometry

Antibodies (Supplementary Table 4) for flow cytometry were provided by BD Biosciences®. Tumors were totally dissociated with a tumor dissociation kit mouse (Miltenyi Biotec®). After filtration and wash, cells were incubated in staining buffer with a mixture of the anti-mouse-conjugated antibodies for 15 min in the dark at 4 °C. Gating was performed among CD45⁺ cells. NK cells were identified as CD3⁻/NKp46⁺, CD8⁺ T cells were identified as CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺ cells, CD4⁺ T cells were identified as CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺ cells, and regulatory T cells were identified as CD45⁺/CD4⁺/CD127^{low} cells. Absolute quantification was obtained using CountBright beads (Invitrogen).

RT-qPCR

Extraction of RNA was performed on 30 mg of tumor with RNA Extraction Kit (Macherey–Nagel, Hoerd, France). To represent tumor heterogeneity, two distant samples from each tumor (4 controls, 5 TRTs) were used. cDNA was

synthesized from 2500 ng of RNA with SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (ThermoFisher, Courtaboeuf, France). Two transcriptase reverse reactions were done for each sample and pooled. qPCRs (Supplementary Table 5) were realized in triplicate with SYBR® Mix (KAPABIOSYSTEMS, Boston, USA) on a StepOnePlus device (Applied Biosystems, Foster City, USA). PCR product specificity was verified with a melting curve procedure. Results were calculated with the $\Delta\Delta\text{CT}$ method after normalizing the expression to that of *Ubiquitin C* and *GAPDH*.

Transcriptomic analyses

Extraction of whole-tumor RNA and reverse transcription were realized using the above protocol. Pre-designed TaqMan probe and primer sets for 64 target genes were chosen from an online catalogue (Applied Biosystems). Gene families were immune response ($n=40$), epithelial–mesenchymal transition ($n=20$) and stemcellness ($n=4$). Once selected, the sets were factory loaded into the 384 wells of TaqMan low-density arrays (TLDA). qPCRs were realized with a TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems). Samples were run and analyzed using the 7900HT system with a TLDA Upgrade (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Gene expression values were calculated with the $\Delta\Delta\text{CT}$ method after normalizing the expression to that of *Gapdh*, *TPB* and *Ubiquitin c*. For each gene, expression in TRT + anti-CTLA-4, TRT + anti-CTLA-4 + anti-PD-1 and TRT + anti-CTLA-4 + anti-PD-L1 tumors was compared to that of TRT alone treated tumors.

Statistics

Statistical analyses were conducted using Stata software (StataCorp, College Station, Texas, USA) and Prism software (GraphPad, San Diego, California, USA). A two-tailed p value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

For RT-qPCR analysis, the fold changes (Control vs TRT) are expressed as mean \pm SD and were compared with Student's t test. The normality assumption was analyzed using Shapiro–Wilk's test. TLDA analyses were compared using one-way ANOVA. For the analysis of repeated measures (tumor growth), the random effects model (REM) was considered, as usually proposed, to study the following fixed effects—treatment groups, time point evaluation and their interaction group \times time – taking into account between- and within-subject variability (as random effect). Censored data (survival) were estimated using the Kaplan–Meier method. The log-rank test was used in univariate analysis

for two-group comparison. These analyses were completed by Cox proportional hazards model applying a Sidak's type I error correction to take into account multiple comparisons. The proportional hazard hypothesis was studied with Schoenfeld's test. Synergy analyses were performed according to Viillard et al. [26].

Results

TRT modulates antitumor immune response

Expression of annexin A1 and calreticulin, which are known immunogenic cell death markers, was assessed using immunofluorescence techniques. We demonstrated that [¹³¹I] ICF01012 significantly increases annexin A1 (Fig. 1a, $p=0.0059$) and calreticulin (Fig. 1b, $p=0.0470$) expression on cell surface ten days after irradiation in a B16F10 tumor model, showing that [¹³¹I]ICF01012 irradiation induces immunogenic cell death.

We treated *Rag2^{KO}* mice to specify the involvement of the adaptive immune system in TRT efficiency. Tumor growth was significantly slower after TRT in C57BL/6 mice compared to *Rag2^{KO}* mice (Fig. 1c). In the TRT-treated wild-type mice, we showed (Fig. 1d, Supplementary Table 1) an extension of median survival (29 days vs. 21 days, $p=0.0182$). In contrast, median survival was not different in both TRT-treated and untreated immunocompromised *Rag2^{KO}* mice (Fig. 1d, Supplementary Table 1, 24 days vs. 21 days, $p=0.6094$). Additionally, survival was similar in both untreated groups (C57BL/6 J vs. *Rag2^{KO}*, 21 days vs. 21 days, $p=0.8763$). These results suggest that [¹³¹I] ICF01012 efficacy relies on the adaptive immune system to be fully efficient.

Flow cytometry analyses revealed an initial decrease in CD45⁺ leucocytes, CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes and NK cells three days after TRT injection (Fig. 2a); however, this decrease was non-significant. This could be related to a peripheral hematotoxicity due to non-specific radiation effect of [¹³¹I]ICF01012. However, twelve days after TRT injection, CD8⁺ and CD4⁺ T populations significantly increased in tumors compared to control ($p=0.0351$ and $p=0.0347$, respectively) while NK cell population increased at day 6 without reaching statistical significance (Fig. 2a). Additionally, we observed a non-significant increase in CD4⁺ CD127^{low} T regulatory cell population at day 12 in the treated tumors ($p=0.0977$).

RT-qPCR analyses (Fig. 2b) at day 10 strengthened the flow cytometry data by showing a twofold increase in the *Adgre1* (*Emr1*) and *Ncr1* (*Nkp46*) gene transcripts ($p=0.0416$ and $p=0.0285$, respectively) suggesting a

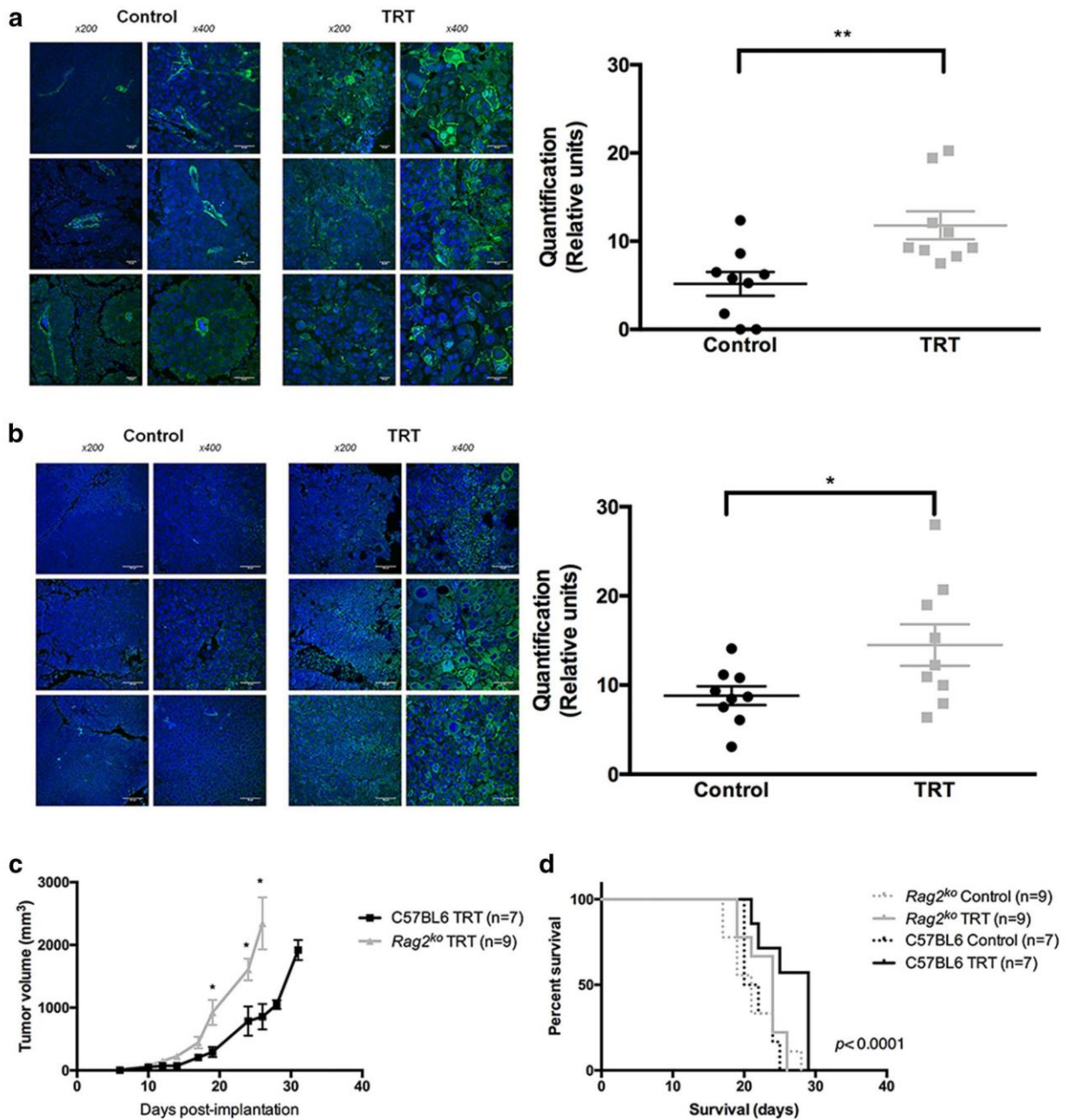


Fig. 1 TRT induces immunogenic cell death (**a**, **b**) and depends on adaptive immune response (**c**, **d**). Cell surface expression of (**a**) annexin A1 and (**b**) calreticulin was assessed by immunofluorescence on control and treated B16F10 tumors 10 days after TRT. TRT effects

on (**c**) tumor growth and (**d**) survival were compared in immunocompetent C57BL/6 J ($n=15$) and immunocompromised *Rag2^{ko}* mice ($n=9$). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

TRT-induced upregulation of the innate immune response within tumor microenvironment. Additionally, we observed expression modifications in genes related to adaptive immunity after [¹³¹I]ICF01012 injection. Antitumor cytotoxic

response genes were upregulated, with a 1.5-fold increase for *Cd8a*, *Ifn γ* and *Tnf α* ($p=0.0256$, $p=0.0456$ and $p=0.0884$, respectively) and a threefold increase for *Gzmb* ($p=0.0358$). The transcription of genes involved in immune tolerance

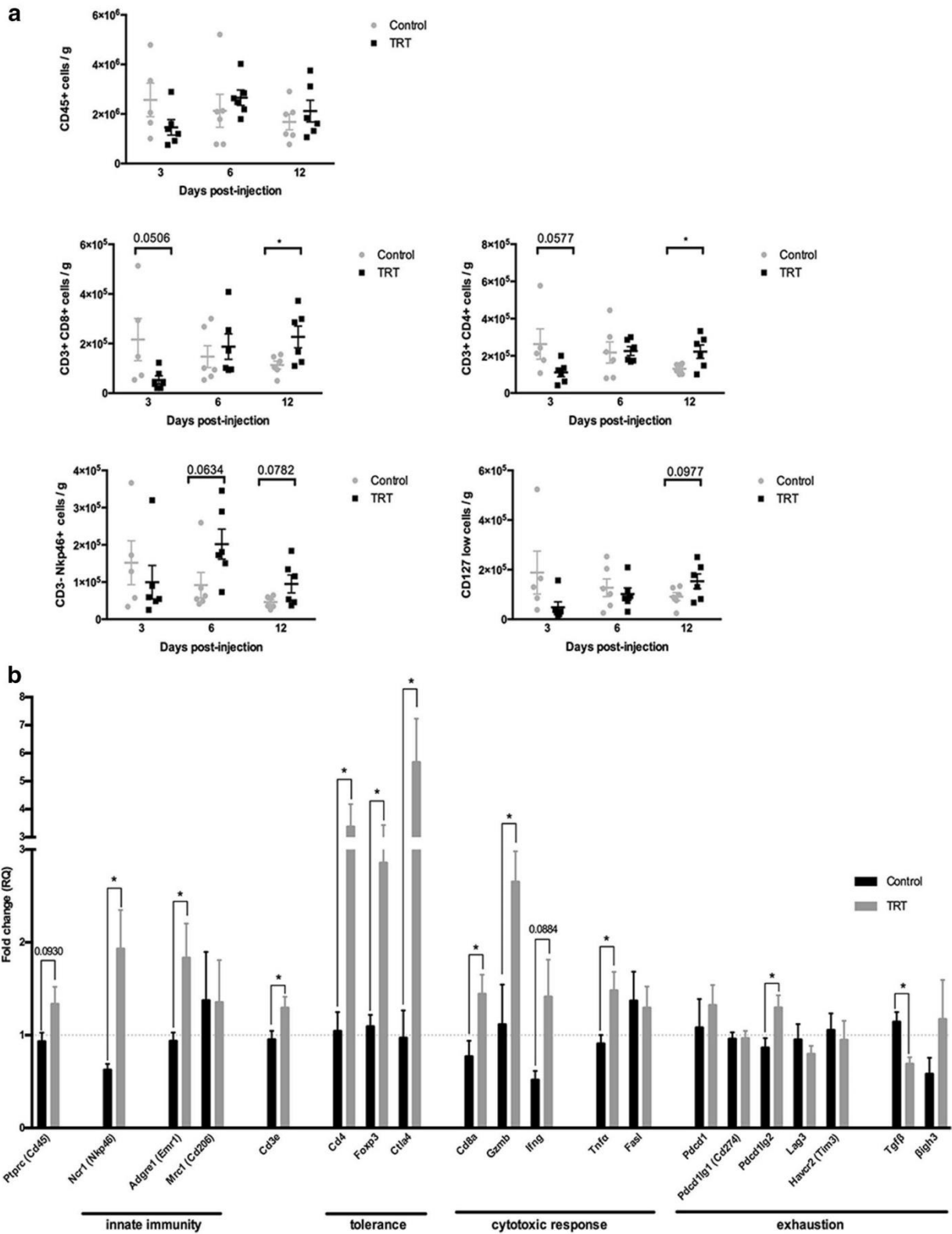


Fig. 2 TRT modifies tumor immune microenvironment. (a) Number of tumor infiltrating lymphocytes per gram was quantified by flow cytometry 3 days, 6 days and 12 days after irradiation ($n=6$ per time and condition). Gating was performed among $CD45^+$ cells. NK cells were identified as $CD3^+/NKp46^+$, CD8 T cells were identified as $CD3^+/CD8^+$ cells, CD4 T cells were identified as $CD3^+/CD4^+$ cells, and regulatory T cells were identified as $CD4^+/CD127^{low}$ cells. (b) Expression of immune response genes ten days after TRT assessed by RT-qPCR on two distant samples from each tumor (control: $n=4$, TRT: $n=5$)

and regulatory T cells was significantly increased: four-fold change for *Cd4* and *Foxp3* ($p=0.0260$ and $p=0.0123$, respectively) and sixfold change for *Ctla4* ($p=0.0385$). Exhaustion-related gene expression was not modified after TRT except *Pdcd1lg2*, which was significantly higher (1.5-fold change, $p=0.0325$).

These findings highlight the intratumoral recruitment of cytotoxic T cells, macrophages, NK cells and regulatory T cells after [^{131}I]ICF01012 injection. They also suggest that tolerogenic mechanisms prevail in the TRT-related immune response, whereas exhaustion seems less preponderant.

[^{131}I]ICF01012 combined with immune checkpoint inhibitors

To assess further the role of exhaustion and tolerance in TRT-mediated immune response, we tested TRT combination with ICIs in B16F10 model. Survival and individual growth curves are shown in Fig. 3, and survival medians and tumor growth information are summarized in Table 1. Groups receiving the IgG isotype were not significantly different compared to control and TRT alone groups (Fig. 3b, Table 1).

[^{131}I]ICF01012 induces tolerogenic immune mechanisms

To determine the importance of T cell exhaustion during TRT, we combined [^{131}I]ICF01012 with an anti-PD-1 antibody (Fig. 3c) or with an anti-PD-L1 antibody (Fig. 3d). Anti-PD1-groups showed a significant survival increase compared to TRT alone ($p<0.0001$) suggesting exhaustion mechanisms in non-treated tumors. However, TRT + anti-PD-1 survival was similar to the anti-PD-1 group (30 days). Interestingly, the group receiving TRT + anti-PDL-1 exhibited a small non-significant increase in survival compared to the anti-PD-L1 group (34 days vs 25 days, $p=0.104$). In TRT + ICI groups, tumor doubling times (DT) were not significantly different from the ICI alone groups (Table 1). These results suggest that $CD8^+$ T cell exhaustion is not preponderant in the TRT-mediated immune response.

RT-qPCR analyses suggested that tolerance is an important mechanism throughout TRT. We combined TRT with anti-CTLA-4 antibody (Fig. 3e). Interestingly, TRT + anti-CTLA-4 group showed a significant increase in survival compared to monotherapy groups (Fig. 3e, Table 2, 41 days vs. 27 days ($p=0.011$), vs. 26 days ($p<0.0001$), respectively). Doubling times in the TRT + anti-CTLA-4 group were also significantly higher compared to TRT alone and anti-CTLA-4 alone groups (Fig. 4c, 7.088 days^{-1} vs 3.808 days^{-1} vs 3.713 days^{-1} , respectively; $p<0.0001$). Additionally, combining TRT with anti-CTLA-4 extended the slow growth phase (26 days for TRT + anti-CTLA-4 vs. 19 days for anti-CTLA-4 alone). Furthermore, the interaction between TRT and anti-CTLA-4 was synergistic ($HR_{TRT+anti-CTLA-4} (0.08) < [HR_{TRT} (0.626) \times HR_{anti-CTLA-4} (0.419)] = 0.262$) [27], suggesting a major contribution of tolerance in the TRT-mediated immune response.

TRT-induced tolerance reversal by anti-CTLA-4 Ab treatment favors T cell exhaustion

Induction of exhaustion occurs when anti-CTLA-4 is combined with external radiotherapy [10]. We hypothesized that the same phenomenon could occur during TRT. We added anti-PD-1 (Fig. 4a) or anti-PD-L1 (Fig. 4b) to the combination of TRT + anti-CTLA-4. On the one hand, the addition of anti-PD1 to the combination TRT + anti-CTLA-4 induced a 2.5 days gain of survival associated with a higher DT (Fig. 4c, 7.544 days^{-1} vs 7.088 days^{-1} , ns). On the other hand, combining TRT + anti-CTLA-4 with anti-PD-L1 did not modify DT or median survival compared to TRT + anti-CTLA-4. However, the effects of this combination led to a more homogeneous response in terms of slow growth and DT compared to TRT + anti-CTLA-4. Interestingly, TRT + anti-CTLA-4 + anti-PD-L1 ($HR_{TRT+anti-CTLA-4+anti-PD-L1} (0.175) < [HR_{TRT} (0.632) \times HR_{anti-CTLA-4+anti-PD-L1} (0.404)] = 0.255$) was a synergistic combination, whereas TRT + anti-CTLA-4 + anti-PD-1 was only an additive association.

Using TLDA analyses (Fig. 4d), we compared TRT + anti-CTLA-4 gene expression with the gene expression of TRT + anti-CTLA-4 + anti-PD-1 group and TRT + anti-CTLA-4 + anti-PD-L1 group. TLDA analyses showed an increase in the exhaustion-related genes *Cd274*, *Lag3* and *Eomes* in the TRT + anti-CTLA-4 group compared to TRT + anti-CTLA-4 + anti-PD-1 ($p=0.0022$, $p=0.0079$ and $p=0.1438$, respectively) and to TRT + anti-CTLA-4 + anti-PD-L1 group ($p=0.0031$, $p=0.0670$ and $p=0.0396$, respectively). The addition of anti-PD-1 or anti-PD-L1 to TRT-CTLA4 combination induced a return to control values for

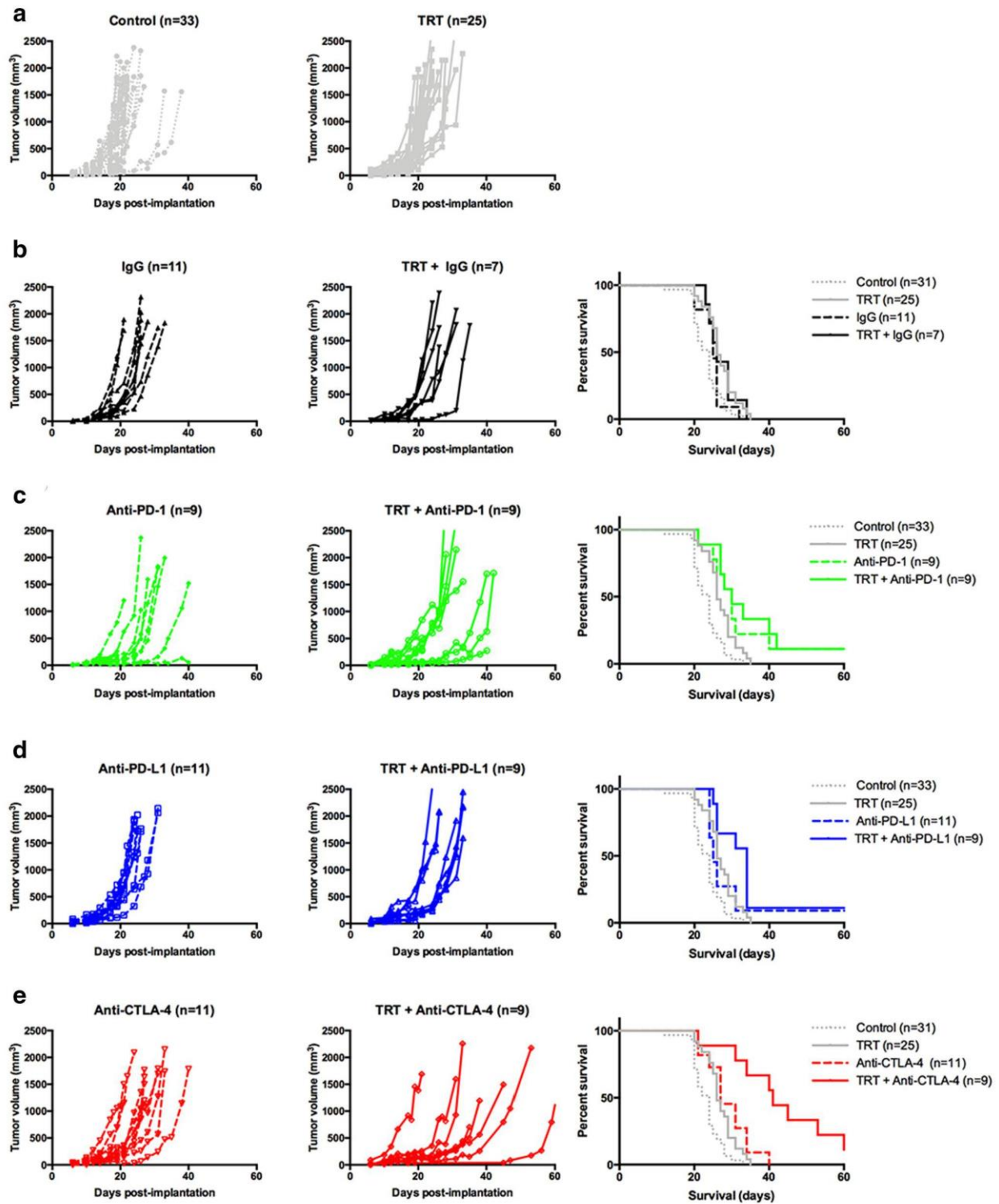


Fig. 3 TRT combination with immune checkpoint inhibitors in monotherapy. Individual growth curves were represented for each pair of groups (control and TRT): (a) without immune checkpoint inhibitor, (b) isotype IgG, (c) anti-PD-1, (d) anti-PD-L1, (e) anti-CTLA-4.

Kaplan-Meier survival curves were represented for each immune checkpoint inhibitor and compared with control and TRT group. Median survival and doubling times are resumed in Table 1

Table 1 Survival and tumor growth characteristics for TRT + immune checkpoint inhibitor combination

| Group | Median survival (days) | <i>p</i> | Doubling times (days ⁻¹) | <i>p</i> |
|---|------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
| Control (<i>n</i> = 33) | 24.0 | 0.058 | 3.10 ± 0.14 | 0.2154 |
| TRT (<i>n</i> = 25) | 26.0 | | 3.81 ± 0.17 | |
| IgG (<i>n</i> = 11) | 25.0 | 0.379 | 2.85 ± 0.15 | > 0.9999 |
| TRT + IgG (<i>n</i> = 7) | 26.0 | | 2.98 ± 0.20 | |
| Anti-PD-1 (<i>n</i> = 9) | 30.0 | 0.693 | 3.34 ± 0.27 | 0.8414 |
| TRT + anti-PD-1 (<i>n</i> = 9) | 30.0 | | 4.09 ± 0.32 | |
| Anti-PD-L1 (<i>n</i> = 11) | 25.0 | 0.104 | 3.30 ± 0.21 | 0.5587 |
| TRT + anti-PD-L1 (<i>n</i> = 9) | 34.0 | | 4.25 ± 0.43 | |
| Anti-CTLA-4 (<i>n</i> = 11) | 27.0 | 0.011 | 3.71 ± 0.32 | < 0.0001 |
| TRT + anti-CTLA-4 (<i>n</i> = 9) | 41.0 | | 7.09 ± 0.99 | |
| Anti-PD1 + anti-CTLA-4 (<i>n</i> = 10) | 38.0 | 0.794 | 5.84 ± 0.60 | 0.0391 |
| TRT + anti-PD-1 + anti-CTLA-4 (<i>n</i> = 10) | 43.5 | | 7.54 ± 0.64 | |
| Anti-PD-L1 + anti-CTLA-4 (<i>n</i> = 10) | 29.5 | 0.091 | 4.74 ± 0.43 | 0.0003 |
| TRT + anti-PD-L1 + anti-CTLA-4 (<i>n</i> = 10) | 36.0 | | 7.07 ± 0.66 | |

these three genes. All these results suggest that anti-CTLA-4 combined to TRT contributes to induce exhaustion.

[¹³¹I]ICF01012 combined with an original immunotherapy: TRT + anti-βig-h3

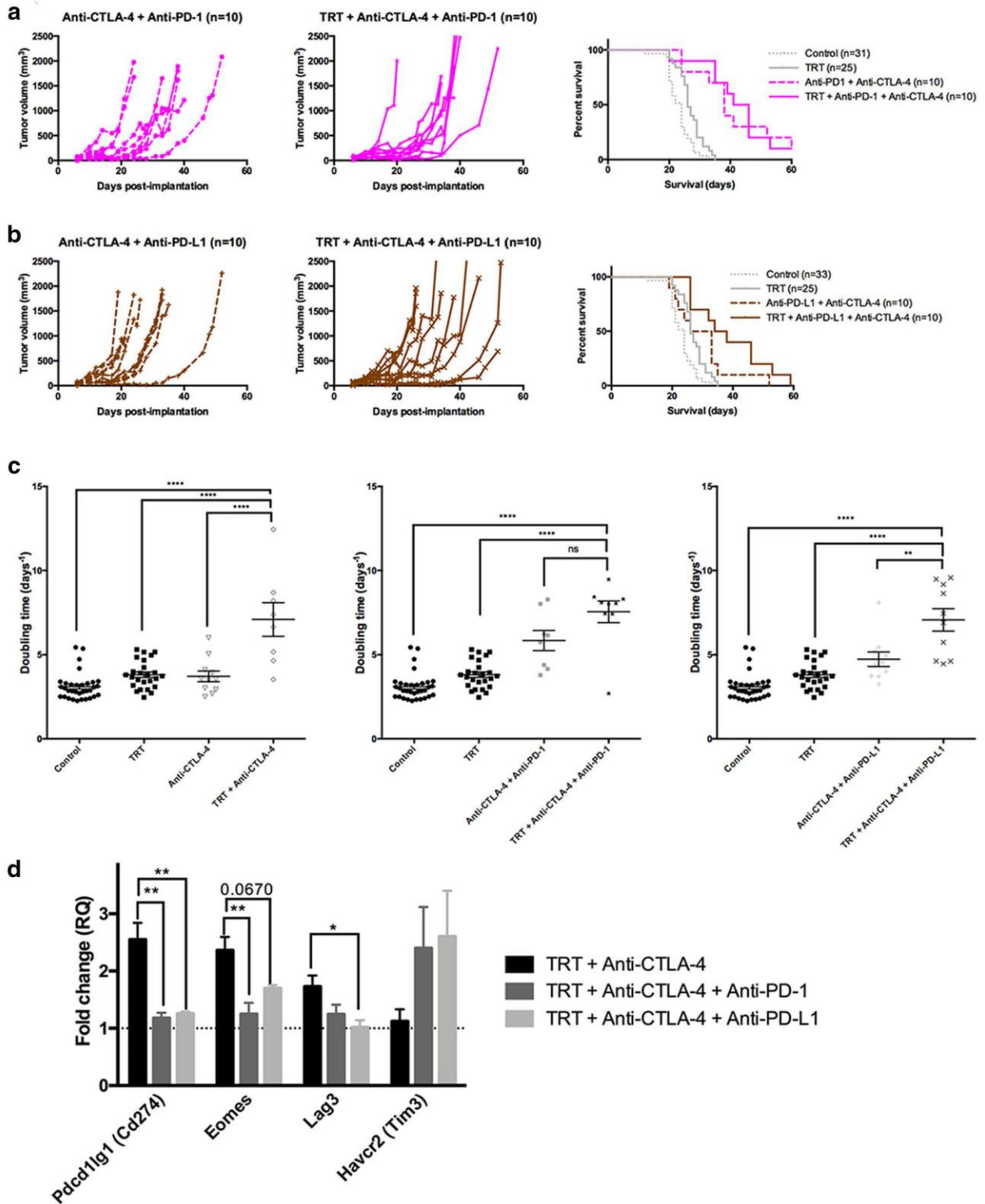
We have tested the effect of an anti-βig-h3mAb alone or combined with [¹³¹I]ICF01012 in B16F10 model. Groups receiving the IgG isotype (Fig. 5b) did not show differences compared to the control and TRT alone groups (Fig. 5a). Anti-βig-h3 alone did not modify median survival compared to control group (Fig. 5c, 24 days). TRT + anti-βig-h3 group survival was significantly longer compared to anti-βig-h3 alone (29 days vs 24 days, *p* = 0.0297). However, median survival in the combination TRT + anti-βig-h3 group did not reach statistical significance compared to other TRT groups. However, we showed a survival gain of 1.5 day (Supplementary Table 2). Additionally, we demonstrated a significant difference of tumor doubling times between the anti-βig-h3 group and TRT + anti-βig-h3 group (*p* = 0.0121), with a difference between means of 0.94 ± 0.33 days (Fig. 5d).

Discussion

This study allows a complete characterization of TRT-induced modifications in the antitumor immune response in the syngeneic B16F10 model. We demonstrate here that TRT using [¹³¹I]ICF01012 induces immunogenic cell death which contributes to adaptive immune cell recruitment to the tumoral site. Thus, the efficacy of [¹³¹I]ICF01012 on

pigmented melanoma depends on the immune system and particularly on the adaptive immune response, as we established by comparing TRT effects between immunocompetent and immunodeficient mice. We also highlight that TRT modifies tumor immune microenvironment, especially by inducing cytotoxic T response and stimulating recruitment of innate immune cells as NK cells and macrophages. Similar to EBRT, escape mechanisms also occur throughout TRT. We demonstrate that tolerance, as well as regulatory T cell recruitment, is one of the main immune escape mechanisms in TRT. Additionally, the immunologic tolerance induced by TRT could be overcome by the use of an anti-CTLA-4 antibody at the cost of an induction of exhaustion, which could, however, be counteracted by the addition of an anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibody. This hypothesis is supported by a previous study [10] on external radiation therapy by Twyman-Saint Victor et al.

Finally, we show that combining TRT and ICI is a promising approach for melanoma treatment. It indeed results without exception in a prolonged survival (*p* < 0.0001) compared to [¹³¹I]ICF01012 alone, especially in the case when ICI alone does not modify tumor growth (i.e., anti-CTLA-4, anti-PD-L1). Combining TRT + anti-CTLA-4 is the most promising combination with a significant increase in survival (15 days). Furthermore, approximately 22% of TRT + anti-CTLA-4-treated mice survived longer than 60 days, and one mouse turned out to be a very long responder (> 200 days). Interestingly, these results are quite similar to the observations [10] made by Twyman-Saint Victor et al. for the EBRT + anti-CTLA-4 combination in a B16F10 murine model. Contrasting with the



◀**Fig. 4** TRT combination with dual immune checkpoint inhibitors. Individual growth curves were represented for each pair of groups (control and TRT): (a) anti-PD-1+anti-CTLA-4, (b) anti-PD-L1+anti-CTLA-4. Kaplan–Meier survival curves were represented for each dual immune checkpoint inhibitor and compared with control and TRT group, (c) doubling times for anti-CTLA-4 groups, anti-PD-1+anti-CTLA-4 groups and anti-PD-L1+anti-CTLA-4 groups. (d) Exhaustion-related gene expression for anti-CTLA-4 groups, anti-PD-1+anti-CTLA-4 groups and anti-PD-L1+anti-CTLA-4 groups. Median survival and doubling times are resumed in Table 1.

results [19] reported by Choi et al., we observed a longer survival with either TRT alone, anti-CTLA-4 alone or ICI + TRT combination than what they described with dual ICI combined with TRT. This could be explained by three different factors: the fact that [¹³¹I]ICF01012 does not target immune cells, the use of a lower dose (18.5 MBq vs 30 MBq) to limit hematotoxicity and the [¹³¹I]ICF01012 pharmacokinetics (i.e., rapid clearance of non-target organs). We highlight also the safety of this type of combination without reporting any adverse events, especially no immune-related toxicity or melanin-related toxicity. Association of TRT with anti-βig-h3 shows an extend of

survival that could probably be more detectable had we used a more immunogenic model such as B16-OVA [28, 29]. However, demonstrating efficiency of TRT + ICI combination in the less immunogenic murine B16F10 model is really promising for clinical use in human melanoma treatment since human melanoma has a higher mutational burden that leads to higher immunogenicity. These results validate the development of clinical trials for this type of combination. However, keeping in mind that murine and human melanoma have not the same immune behavior [28], anti-PD-1 should also be considered for combination as it is the most efficient ICI in human.

To conclude, we extend the knowledge on TRT-mediated immune response, demonstrating that tolerance is a prominent mechanism during [¹³¹I]ICF01012 irradiation. [¹³¹I]ICF01012 appears to be a good candidate in order to be used in combination with ICIs, with the advantages of a specific targeting and a high number of pigmented metastases treated at once. We eagerly expect the toxicity results of the phase 1 trial before proceeding with TRT + ICI combination therapy in a clinical trial.

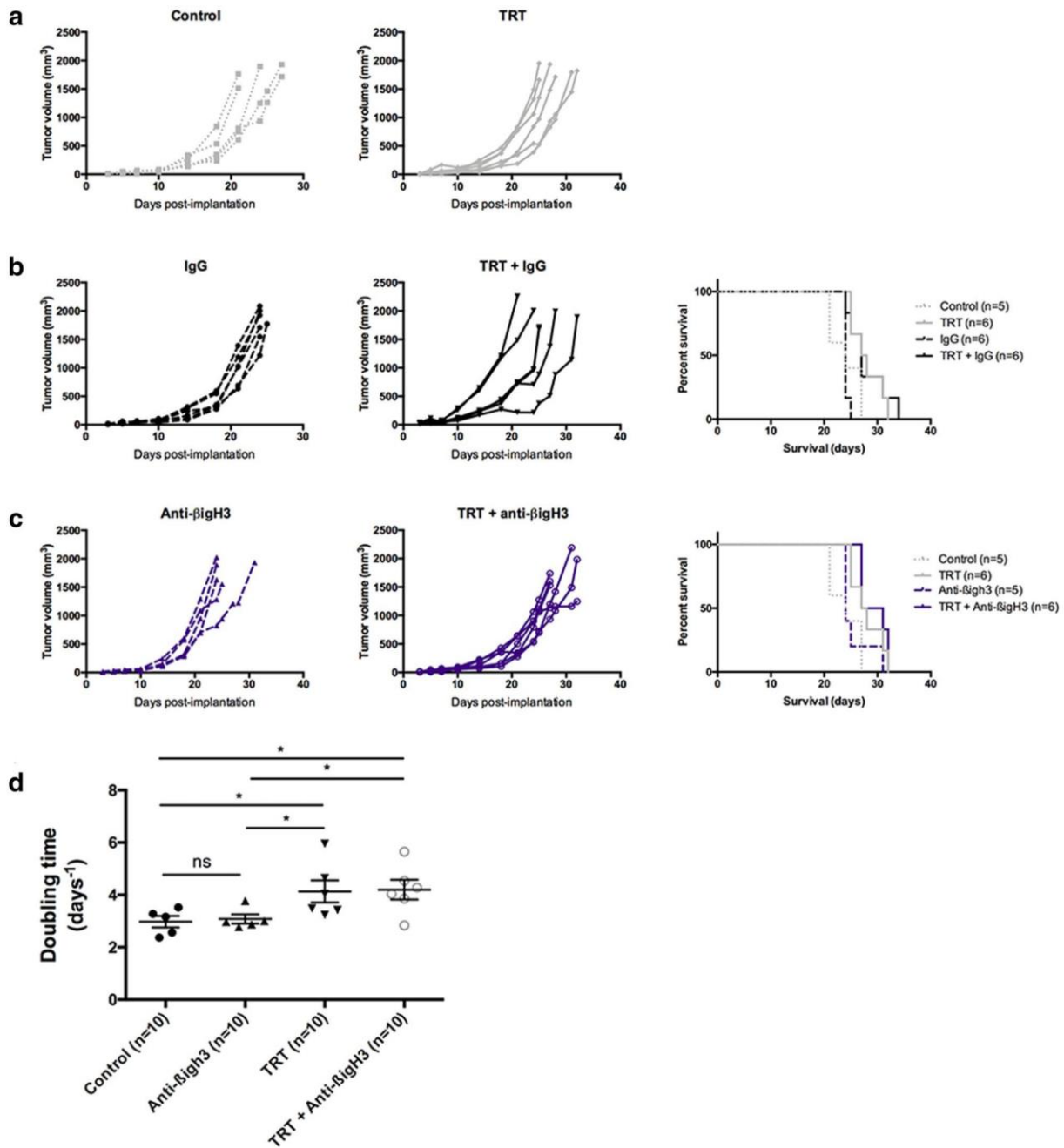


Fig. 5 TRT combination with anti-βig-h3 antibody. Individual growth curves were represented for each pair of groups (control and TRT): (a) without immunotherapy, (b) isotype IgG, (c) anti-βig-h3. Kaplan–Meier survival curves were represented for each dual immune check-

point inhibitor and compared with control and TRT group. (d) Doubling times for control, TRT, anti-βig-h3 alone and TRT + anti-βig-h3 groups. Median survival and doubling times are resumed in Table S2

Acknowledgements We are grateful to C.VACCHIAS from confocal imaging platform (CLIC) and to C.SOUBEYRAND-DAMON from histopathology platform (ANIPATH) for their pertinent advices. We thank M.GEMBARA for his kind proofreading of the English manuscript.

Author contributions JR, AH, SM, MD, FD and POR contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by JR, VB, HA, SB, PA and SD. BP performed statistical analyses. The first draft of the manuscript was written by JR, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This study was supported by the SFD – French Society for Dermatology and by the Ligue Régionale Contre le Cancer. J. ROUA-NET is supported by a doctoral fellowship granted by the SFD. H. AKIL was supported by a fellowship from the Auvergne Regional council and the European Community. A. Hennino is supported by INSERM TRANSFERT, Fondation Bristol-Meyers Squibb and La Ligue Régionale Contre le Cancer.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval Experimentations on mice were in conformity with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (8th edition, 2011) and were approved by local Ethic committee of Clermont-Ferrand (C2E2A No. 002) and French Ministry of Education and Research (Approval No. 12211). This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

References

- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Shefler E, Cortes ML, Auclair D, Saksena G, Voet D, Noble M, DiCara D, Lin P, Lichtenstein L, Heiman DI, Fennell T, Imielinski M, Hernandez B, Hodis E, Baca S, Dulak AM, Lohr J, Landau DA, Wu CJ, Melendez-Zajgla J, Hidalgo-Miranda A, Koren A, McCarroll SA, Mora J, Crompton B, Onofrio R, Parkin M, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Roberts CWM, Biegel JA, Stegmaier K, Bass AJ, Garraway LA, Meyer-son M, Golub TR, Gordenin DA, Sunyaev S, Lander ES, Getz G (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499(7457):214–218. <https://doi.org/10.1038/nature12213>
- Lee N, Zakka LR, Mihm MC Jr, Schatton T (2016) Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy. *Pathology* 48(2):177–187. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2015.12.006>
- Portella L, Scala S (2019) Ionizing radiation effects on the tumor microenvironment. *Semin Oncol*. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.07.003>
- Mason R, Au L, Ingles Garcés A, Larkin J (2019) Current and emerging systemic therapies for cutaneous metastatic melanoma. *Expert Opin Pharmacother* 20(9):1135–1152. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1601700>
- Tai X, Van Laethem F, Pobeziński L, Guinter T, Sharrow SO, Adams A, Granger L, Kruhlik M, Lindsten T, Thompson CB, Feigenbaum L, Singer A (2012) Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood* 119(22):5155–5163. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-388918>
- McDermott DF, Atkins MB (2013) PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med* 2(5):662–673. <https://doi.org/10.1002/cam4.106>
- Lauden L, Siewiera J, Boukouaci W, Ramgolam K, Mourah S, Lebbe C, Charron D, Aoudjit F, Jabrane-Ferrat N, Al-Daccak R (2014) TGF-beta-induced (TGFB1) protein in melanoma: a signature of high metastatic potential. *J Invest Dermatol* 134(6):1675–1685. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.20>
- Goehrig D, Nigri J, Samain R, Wu Z, Cappello P, Gabiane G, Zhang X, Zhao Y, Kim IS, Chanal M, Curto R, Hervieu V, de La Fouchardiere C, Novelli F, Milani P, Tomasini R, Bousquet C, Bertolino P, Hennino A (2019) Stromal protein betaig-h3 reprogrammes tumour microenvironment in pancreatic cancer. *Gut* 68(4):693–707. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317570>
- Bauer CA (2019) Immunosuppressive betaig-h3 links tumour stroma and dysfunctional T cells in pancreatic cancer. *Gut* 68(4):581. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317735>
- Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, Benci JL, Xu B, Dada H, Odorizzi PM, Herati RS, Mansfield KD, Patsch D, Amaravadi RK, Schuchter LM, Ishwaran H, Mick R, Pryma DA, Xu X, Feldman MD, Gangadhar TC, Hahn SM, Wherry EJ, Vonderheide RH, Minn AJ (2015) Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* 520(7547):373–377. <https://doi.org/10.1038/nature14292>
- Levy A, Massard C, Soria JC, Deutsch E (2016) Concurrent irradiation with the anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint blocker durvalumab: Single centre subset analysis from a phase 1/2 trial. *Eur J Cancer* 68:156–162. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.09.013>
- Roger A, Finet A, Boru B, Beauchet A, Mazon JJ, Otmeguisse Y, Blom A, Longvert C, de Maleissye MF, Fort M, Funck-Brentano E, Saiag P (2018) Efficacy of combined hypo-fractionated radiotherapy and anti-PD-1 monotherapy in difficult-to-treat advanced melanoma patients. *Oncimmunology* 7(7):e1442166. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1442166>
- Pitt JM, Kroemer G, Zitvogel L (2017) Immunogenic and Non-immunogenic Cell Death in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1036:65–79. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0_5
- Baracco EE, Stoll G, Van Endert P, Zitvogel L, Vacchelli E, Kroemer G (2019) Contribution of annexin A1 to anticancer immunosurveillance. *Oncimmunology*. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1647760>
- Wu Y, Pfeifer AK, Myschetzky R, Garbyal RS, Rasmussen P, Knigge U, Bzorek M, Kristensen MH, Kjaer A (2013) Induction of anti-tumor immune responses by peptide receptor radionuclide therapy with (177)Lu-DOTATATE in a murine model of a human neuroendocrine tumor. *Diagnostics (Basel)* 3(4):344–355. <https://doi.org/10.3390/diagnostics3040344>
- Keisari Y, Hochman I, Confino H, Korenstein R, Kelson I (2014) Activation of local and systemic anti-tumor immune responses by ablation of solid tumors with intratumoral electrochemical or alpha radiation treatments. *Cancer Immunol Immunother* 63(1):1–9. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1462-2>
- Chakraborty M, Gelbard A, Carrasquillo JA, Yu S, Mamede M, Paik CH, Camphausen K, Schlom J, Hodge JW (2008) Use of radiolabeled monoclonal antibody to enhance vaccine-mediated antitumor effects. *Cancer Immunol Immunother* 57(8):1173–1183. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0449-x>
- Hernandez R, Walker KL, Grudzinski JJ, Aluicio-Sarduy E, Patel R, Zahm CD, Pinchuk AN, Massey CF, Bitton AN, Brown RJ, Sondel PM, Morris ZS, Engle JW, Capitini CM, Weichert JP (2019) (90)Y-NM600 targeted radionuclide therapy induces immunologic memory in syngeneic models of T-cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Commun Biol* 2:79. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0327-4>
- Choi J, Beaino W, Fecak R, Fabian K, Laymon CM, Kurland B, Storkus W, Anderson CJ (2018) Combination treatment of VLA-4 targeted radionuclide therapy and immunotherapy in a mouse model of melanoma. *J Nucl Med*. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.209510>
- Chezal JM, Papon J, Labarre P, Lartigue C, Galmier MJ, Decombat C, Chavignon O, Maublant J, Teulade JC, Madelmont JC,

- Moins N (2008) Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma. *J Med Chem* 51(11):3133–3144. <https://doi.org/10.1021/jm701424g>
21. Bonnet M, Mishellany F, Papon J, Cayre A, Penault-Llorca F, Madelmont JC, Miot-Noirault E, Chezal JM, Moins N (2010) Anti-melanoma efficacy of internal radionuclide therapy in relation to melanin target distribution. *Pigment Cell Melanoma Res* 23(5):e1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00716.x>
 22. Bonnet-Duquennoy M, Papon J, Mishellany F, Labarre P, Guerin-Kern JL, Wu TD, Gardette M, Maublant J, Penault-Llorca F, Miot-Noirault E, Cayre A, Madelmont JC, Chezal JM, Moins N (2009) Targeted radionuclide therapy of melanoma: anti-tumoural efficacy studies of a new ¹³¹I labelled potential agent. *Int J Cancer* 125(3):708–716. <https://doi.org/10.1002/ijc.24413>
 23. Viallard C, Perrot Y, Boudhraa Z, Jouberton E, Miot-Noirault E, Bonnet M, Besse S, Mishellany F, Cayre A, Maigne L, Rbah-Vidal L, D'Incan M, Cachin F, Chezal JM, Degoul F (2015) [(1)(2)(3)I]ICF01012 melanoma imaging and [(1)(3)(1)I]ICF01012 dosimetry allow adapted internal targeted radiotherapy in preclinical melanoma models. *Eur J Dermatol* 25(1):29–35. <https://doi.org/10.1684/ejd.2014.2481>
 24. Degoul F, Borel M, Jacquemot N, Besse S, Communal Y, Mishellany F, Papon J, Penault-Llorca F, Donnarieix D, Doly M, Maigne L, Miot-Noirault E, Cayre A, Cluzel J, Moins N, Chezal JM, Bonnet M (2013) In vivo efficacy of melanoma internal radionuclide therapy with a ¹³¹I-labelled melanin-targeting heteroarylcarboxamide molecule. *Int J Cancer* 133(5):1042–1053. <https://doi.org/10.1002/ijc.28103>
 25. Akil H, Rouanet J, Viallard C, Besse S, Auzeloux P, Chezal JM, Miot-Noirault E, Quintana M, Degoul F (2019) Targeted radionuclide therapy decreases melanoma lung invasion by modifying epithelial-mesenchymal transition-like mechanisms. *Transl Oncol* 12(11):1442–1452. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.07.015>
 26. Viallard C, Chezal JM, Mishellany F, Ranchon-Cole I, Pereira B, Herbet A, Besse S, Boudhraa Z, Jacquemot N, Cayre A, Miot-Noirault E, Sun JS, Dutreix M, Degoul F (2016) Targeting DNA repair by coDbait enhances melanoma targeted radionuclide therapy. *Oncotarget* 7(11):12927–12936. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7340>
 27. Raitanen M, Rantanen V, Kulmala J, Helenius H, Grenman R, Grenman S (2002) Supra-additive effect with concurrent paclitaxel and cisplatin in vulvar squamous cell carcinoma in vitro. *Int J Cancer* 100(2):238–243. <https://doi.org/10.1002/ijc.10472>
 28. Yu JW, Bhattacharya S, Yanamandra N, Kilian D, Shi H, Yadavilli S, Katlinskaya Y, Kaczynski H, Conner M, Benson W, Hahn A, Seestaller-Wehr L, Bi M, Vitali NJ, Tsvetkov L, Halsey W, Hughes A, Traini C, Zhou H, Jing J, Lee T, Figueroa DJ, Brett S, Hopson CB, Smothers JF, Hoos A, Srinivasan R (2018) Tumor-immune profiling of murine syngeneic tumor models as a framework to guide mechanistic studies and predict therapy response in distinct tumor microenvironments. *PLoS ONE* 13(11):e0206223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206223>
 29. Schae D, Ratikan JA, Iwamoto KS, McBride WH (2012) Maximizing tumor immunity with fractionated radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83(4):1306–1310. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.09.049>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

RÉSUMÉ

L'annexine A1 (ANXA1) appartient à la vaste superfamille des annexines qui englobe des protéines capables de se lier aux phospholipides membranaires de façon calcium dépendante. C'est une protéine multifonctionnelle initialement décrite pour ses propriétés anti-inflammatoires. Elle est présente dans le noyau, le cytosol et les membranes cellulaires et peut également être sécrétée et clivée dans le milieu environnant. L'ANXA1 présente un important intérêt en oncologie du fait de sa dérégulation dans de nombreux cancers. En fonction des types de cancers, l'ANXA1 est surexprimée ou sous-exprimée par rapport au tissu sain. Elle est surexprimée dans le cancer du sein triple négatif par rapport aux autres sous-types de tumeurs mammaires et dans les mélanomes par rapport aux mélanocytes. Dans ces deux pathologies, bien que l'ANXA1 soit associée aux processus de prolifération, migration et invasion, les mécanismes précis de son rôle au sein d'une tumeur restent mal connus, notamment ceux impliquant la fraction extracellulaire. Les études menées sur des souris n'exprimant pas l'*Anxa1* ont également montré que l'ANXA1 stromale est impliquée dans le développement et la progression tumorale.

Le premier objectif a donc été de tester la possibilité de bloquer la protéine extracellulaire via un anticorps monoclonal breveté, le VJ4B6, pour diminuer la migration (*in vitro*) et la dissémination (*in vivo*). Nos données montrent que le VJ4B6 ne permet pas de limiter la migration cellulaire des lignées de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231-luc) et de mélanome (SK-MEL-28 et A375-MA2) présentant de l'ANXA1 extracellulaire. Cet anticorps ne permet pas non plus de limiter le développement et la dissémination tumorale du mélanome B16Bl6 *in vivo*.

Le second objectif a été d'étudier le rôle de l'ANXA1 tumorale et stromale dans le développement et la dissémination du mélanome. Nos résultats ont montré que l'ANXA1 tumorale est impliquée dans la prolifération des cellules A375-MA2 et SK-MEL-28 *in vitro*. L'utilisation de souris invalidées pour l'*Anxa1* a également permis de mettre en évidence que l'ANXA1 stromale favorise le développement tumoral et la formation de métastases des cellules murines B16Bl6 *in vivo*. De façon intéressante, les études réalisées sur les tumeurs ont montré que l'absence d'ANXA1 stromale limite la prolifération des cellules tumorales ainsi que l'angiogenèse. Ceci peut donc expliquer la progression limitée des tumeurs chez les souris invalidées. De plus, les tumeurs développées chez ces dernières présentent une surexpression des marqueurs lymphocytaires (CD3, CD4, FoxP3, CD8a, NKp46) par rapport à celles développées chez les souris sauvages. Cet afflux lymphocytaire concerne à la fois les lymphocytes pro- et anti-tumoraux. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce dernier soit une conséquence d'une perméabilité accrue des vaisseaux tumoraux au niveau des tumeurs des souris invalidées pour l'*Anxa1*.

Mots clés: annexine A1 extracellulaire, cancer du sein triple négatif, mélanome, progression tumorale, microenvironnement, immunité, angiogenèse.